



# Caractérisation de suppresseurs de la mort cellulaire programmée chez *Arabidopsis thaliana*

Quentin Bruggeman

## ► To cite this version:

Quentin Bruggeman. Caractérisation de suppresseurs de la mort cellulaire programmée chez *Arabidopsis thaliana*. Biologie végétale. Université Paris Sud - Paris XI, 2014. Français. NNT : 2014PA112317 . tel-01359170

**HAL Id: tel-01359170**

**<https://theses.hal.science/tel-01359170>**

Submitted on 2 Sep 2016

**HAL** is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

UNIVERSITE PARIS-SUD

ÉCOLE DOCTORALE : SCIENCES DU VÉGÉTAL  
Institut de Biologie des Plantes

*DISCIPLINE : BIOLOGIE*

THÈSE DE DOCTORAT

Soutenance prévue le 14/11/2014

par

Quentin BRUGGEMAN

Caractérisation de suppresseurs de la mort cellulaire programmée chez <i>Arabidopsis thaliana</i>
------------------------------------------------------------------------------------------------------

Composition du jury :

<i>Directrice de thèse :</i>	Marianne DELARUE	Maître de Conférences (Université Paris-Sud, IBP - Orsay)
<i>Rapporteurs :</i>	Susana RIVAS Pierre CAROL	Directrice de Recherche (INRA, LIPM -Toulouse) Professeur (UPMC - Paris)
<i>Examineurs :</i>	Christophe LALOI Patrick SAINDRENAN	Maître de Conférences (CEA, LGBP - Université Aix-Marseille) Chargé de Recherche (CNRS, IBP - Orsay)



## Remerciements

Dans un premier temps, je tiens à remercier les membres du jury pour m'avoir fait l'honneur de juger mon travail. Merci à Susana Rivas, Pierre Carol, Christophe Laloï et Patrick Saindrenan pour le temps que vous allez consacrer à lire et examiner ce manuscrit.

Une thèse, c'est comme la recherche scientifique en général, cela ne se fait pas seul, c'est un travail d'équipe obligatoire. Au cours de mes trois années de doctorat, j'ai été entouré, au travail comme dans la vie, de personnes formidables qui ont toutes jouées un rôle, plus ou moins grand, dans le travail présenté ici. Cette partie bien nommée est là pour les remercier.

En premier lieu, un énorme merci à « ma chef », Marianne. Nous avons été amenés à travailler ensemble un peu par la force des choses, mais si c'était à refaire, je signerais à nouveau sans hésitation. Merci de m'avoir donné ma chance. Malgré ton temps déjà bien rempli par tes autres occupations (école doctorale, enseignement, recherche...), tu as su être présente tout au long de ses trois années et encadrer mon travail de manière exemplaire. Tu m'as souvent laissé une grande liberté qui m'a permis de prendre des directions personnelles et la confiance que tu as portée en moi et mon travail m'a permis de gagner en assurance. Travailler avec toi fut vraiment très agréable, d'un point de vue scientifique mais également personnel. J'ai apprécié notre complicité, et c'est avec un certain pincement au cœur que nos chemins vont diverger. Merci pour ces trois années.

Un grand merci à toute l'équipe qui m'a soutenu pendant ces trois années. Un merci à notre « chef » (qui je suis sûr ne doit pas aimer cette appellation), Cécile Raynaud. Travailler à tes côtés a vraiment été une expérience enrichissante. A travers nos discussions, tes nombreuses connaissances et tes expérimentations, tu as fortement contribué aux travaux présentés ici. Un grand merci pour ta relecture attentive de ce manuscrit. Côtayer ta gentillesse fut également un vrai plaisir au quotidien.

Merci à Catherine Bergounioux, qui nous apporte une grande motivation à tous, nous permettant de nous remettre en marche pendant les coups de mou. Merci à toi pour avoir généré le mutant *mips1 oxt6*, à l'origine de nombreux résultats de ma thèse. Travailler avec toi est parfois un peu déprimant, tu as toujours une longueur d'avance ! Un mutant à analyser ou à croiser, un clonage à faire, un phénotypage particulier, vous venez d'y penser, Catherine l'a déjà fait !

Merci à Christelle Mazubert, la reine du clonage incontestée ! Et maintenant, du génotypage ! Ne serait-ce que pour ta participation à certains clonages et génotypages, justement, ton aide fut précieuse au cours de ces trois années. De plus, tu as toujours accepté, sans rechigner, de donner un coup de main, même pour toutes les choses chronophages et ennuyantes (repiquage, récolte de graines...). Manger avec toi tous les jours à la cantine fut aussi une vraie bouteille d'oxygène, et un moyen d'évasion pour se sortir la tête du boulot. Te côtoyer tous les jours fut un réel plaisir, j'ai apprécié ta gentillesse, ta personnalité, et le fait que tu ne juges pas les gens, et ça fait du bien.

J'aimerais aussi remercier Céline Charon. C'est un peu grâce à toi si j'ai pu réaliser cette thèse. Tu m'as permis d'intégrer l'équipe lors de mon M2, et tu m'as fait confiance pour mener à





bien ton sujet de recherche au cours de cette période. Malheureusement, notre collaboration de 6 mois n'a pu aboutir à une thèse de 3 ans, mais travailler avec toi fut un réel plaisir. Tu es profondément gentille, parfois trop (c'est possible ?), et humaine.

Merci à Séverine Domenichini, Elodie Hudik, et Teddy Jégu. Membres de l'équipe et collègues de bureau depuis 1 an, travailler avec vous et vous côtoyer tous les jours a toujours été un plaisir, grâce à votre sympathie et votre gentillesse. Muchas gracias à el señor José-Antonio Pedroza-Garcia. J'admire ton courage. Tu es venu de Mexico te perdre à l'IBP, et malgré cela tu gardes ta sympathie et tu restes un travailleur acharné. Grâce à toi j'ai également pu découvrir à distance le Mexique et le mode de vie de ses habitants. Merci également à Moussa Benhamed et David Latrasse avec qui j'ai apprécié de travailler.

Je n'oublierai pas Florence Prunier, qui a mis au point les techniques pour cartographier les mutations des supprimeurs, et qui a essuyé de nombreux pots cassés avant mon arrivée. Grâce à toi, j'ai commencé ma thèse sur un tapis rouge. J'ai également beaucoup apprécié les mois où nous avons travaillé ensemble. Nous formions un duo vraiment efficace, et c'était un grand plaisir de te côtoyer tous les jours.

Un grand merci à Marie Garmier, qui m'a donné énormément de son temps et transmis de nombreuses compétences, dont la coloration au bleu de trypan, le dosage du SA et les tests pathos qui ne sont que des exemples. Bref, sans toi j'aurais bien galéré, et de nombreuses analyses présentées dans ma thèse n'existeraient pas.

Une thèse et la recherche, cela ne se fait pas sans argent. Je tiens donc à souligner les sources de financement qui ont permis de réaliser les différents travaux présentés dans ce manuscrit. Comme l'ANR MAPIPS, obtenue par l'équipe avant mon arrivée, et l'allocation de la présidence de l'Université Paris-Sud qui m'a permis de vivre en toute indépendance économique.

Durant ces trois années de travail de thèse, je ne peux oublier de remercier les stagiaires que j'ai eu l'opportunité d'encadrer. Merci donc à Tom Messier et Quentin Hocheux pour le travail que vous avez fourni. Vous encadrer fut un réel plaisir et une bonne expérience pour moi aussi.

J'aimerais aussi fêter les thésards de l'IBP avec qui j'ai effectué mon M2. Linda de Bont, Manon Richard et Jean-Claude Pasquet, vous êtes vraiment super, et en toute modestie, nous formons un sacré cru ! Je crois que la relève est bien assurée avec les nouvelles cuvées de thésards représentées par Marie-Sylviane, Younès, Teddy et les autres. Encore que des personnes sympathiques et pleines d'avenir.

Mention spéciale à Linda, qui m'a grandement aidé pour les dosages de glutathion et la mise au point des mesures de l'activité hexokinase. En plus des nombreux résultats que tu présentes dans ton super manuscrit, tu en as aussi dans le mien.

Je voudrais également remercier tous les services communs de l'institut, indispensables à la mise en œuvre de nos travaux recherches. Merci donc à l'équipe administrative, l'équipe de la laverie, notre chasseur Gilles qui prend soin de nos plantes, et Jean-Paul et Eric toujours prêts à



assurer nos demandes de bricolage. Je tiens à remercier tout spécialement Michel Dron, directeur de l'IBP, qui m'a connu au bac à sable et m'a toujours suivi.

Je tiens à remercier les membres de mon comité de thèse Catherine Perrot-Rechenmann, Mathilde Fagard, et Antoine Danon pour leurs très bons conseils et leur disponibilité.

Un grand merci également à Sylvain Merlot pour la mise à disposition de l'ordinateur, du logiciel et pour son aide qui ont permis d'analyser le séquençage des supresseurs.

Je voudrais également remercier des personnes essentielles, qui m'entourent dans la vie. Merci à mes parents pour leur soutien et leur amour sans faille. Merci à mes deux frères, Guillaume et Thibault, les meilleurs frangins qu'on puisse avoir, à qui je souhaite le plus bel avenir et que l'on reste toujours uni ainsi.

Un grand merci à ma belle-famille, pour son soutien et pour m'accepter comme je suis. Je suis également très chanceux de ce côté-là.

Enfin, merci à toi Hélène, d'avoir toujours été là quand j'en avais besoin, et d'avoir cru en moi. Merci pour ta patience et ton aide pendant ces trois années, ainsi que pour ta relecture qui a forgé ce manuscrit. Cette thèse, c'est aussi la tienne ! On devrait être deux sur la couverture. Une nouvelle vie s'offre maintenant à nous, qui je suis sûr sera aussi belle que ces 7 dernières années. Merci pour tout le reste qui ne peut s'écrire avec des mots, mais qui pourrait s'appeler l'amour.



## TABLE DES MATIERES

LISTE DES ABREVIATIONS .....	6
INTRODUCTION.....	10
Avant-propos.....	11
I. <i>Myo</i> -inositol : fonctions et origine dans la plante .....	12
1. Le <i>myo</i> -inositol libre.....	12
1.1. Structure et propriétés chimiques.....	12
1.2. Fonctions du <i>myo</i> -inositol libre dans la plante.....	13
2. Les dérivés du <i>myo</i> -inositol.....	14
2.1. Biosynthèse des dérivés du <i>myo</i> -inositol .....	14
2.2. Fonctions des dérivés du <i>myo</i> -inositol dans la plante .....	16
2.2.1. Au niveau cellulaire.....	16
2.2.2. Au cours du développement de la plante.....	17
2.2.3. Face aux stress environnementaux .....	19
2.2.4. Face aux agents pathogènes .....	21
3. MIPS, une enzyme clé de la biosynthèse du MI .....	22
3.1. Biosynthèse <i>de novo</i> du MI .....	23
3.1.1. Conversion du G6P en Ins(3)P1 par MIPS .....	23
3.1.2. Conversion de l'Ins(3)P1 en MI libre par l'IMP .....	24
3.2. MIPS : une enzyme d'intérêt agronomique .....	25
4. Les gènes <i>MIPS</i> : une famille multigénique chez <i>Arabidopsis thaliana</i> .....	26
4.1. Localisation subcellulaire des différentes isoformes de MIPS chez <i>Arabidopsis</i> .....	27
4.2. Expression des gènes <i>MIPS</i> au cours du développement .....	27
5. Le mutant <i>mips1</i> d' <i>Arabidopsis</i> .....	30
5.1. <i>mips1</i> présente des défauts du développement embryonnaire.....	31
5.2. <i>mips1</i> présente des défauts du développement racinaire .....	33
5.3. Le mutant <i>mips1</i> face aux stress .....	34
II. La Mort Cellulaire Programmée chez les plantes .....	36
1. Caractéristiques et fonctions de la MCP chez les plantes.....	37
1.1. Les marqueurs et les acteurs de la MCP chez les plantes .....	38
1.1.1. Condensation et clivage de l'ADN nucléaire .....	38
1.1.2. Activité protéolytique de type caspase.....	38



1.1.3.	Relargage du cytochrome c et protéines de la famille BCL-2.....	39
1.1.4.	Bax inhibitor-1 et le réticulum endoplasmique.....	40
1.1.5.	La vacuole .....	41
1.2.	Fonctions dans la plante.....	42
2.	La HR, une MCP pour faire face aux agents pathogènes.....	44
2.1.	Les « Lesion Mimic Mutants » et leurs supresseurs.....	46
	Article 1: “To die or not to die ? Lessons from lesion mimic mutants” .....	47
2.2.	Contrôle hormonal de la HR .....	68
2.2.1.	L’acide salicylique .....	68
2.2.2.	L’acide jasmonique .....	70
2.2.3.	L’éthylène.....	71
2.3.	Les conséquences de l’activation de la HR.....	73
III.	Problématique et objectifs de la thèse .....	75
1.	Problématique : le LMM <i>mips1</i> .....	75
2.	Objectifs de la thèse.....	77
	RESULTATS .....	79
I.	Rôle de la protéine CPSF30 dans la MCP chez Arabidopsis.....	80
1.	Introduction .....	80
2.	Résultats .....	80
	Article 2 : “The Polyadenylation Factor Subunit CLEAVAGE AND POLYADENYLATION SPECIFICITY FACTOR30: A Key Factor of Programmed Cell Death and a Regulator of Immunity in Arabidopsis” .....	81
3.	Discussion et perspectives complémentaires.....	97
II.	Le supresseur <i>mips1 somi1</i> .....	100
1.	Introduction .....	100
2.	Résultats .....	101
	Article 3 : “Involvement of the Arabidopsis Hexokinase1 in cell death mediated by <i>myo</i> -inositol accumulation” .....	101
3.	Discussion et perspectives complémentaires.....	121
III.	Le supresseur <i>mips1 somi2</i> .....	122
1.	Introduction .....	122
2.	Résultats .....	123
2.1.	Caractérisations phénotypiques .....	123
2.2.	Analyses métaboliques .....	124





2.3.	Cartographie et identification de <i>SOMI2</i> .....	125
2.4.	Analyse transcriptomique du supprimeur <i>mips1 somi2</i> .....	127
2.5.	Dosages hormonaux.....	129
3.	Discussion et perspectives .....	131
IV.	Le supprimeur <i>mips1 somi3</i> et les chloroplastes .....	134
1.	Introduction .....	134
2.	Résultats .....	135
2.1.	Phénotype du supprimeur <i>mips1 somi3</i> et cartographie de la mutation <i>somi3</i> .....	135
2.2.	Des chloroplastes fonctionnels sont requis pour le développement des lésions chez <i>mips1</i> .....	136
2.3.	La MCP induite chez <i>mips1</i> est contrôlée localement par la lumière .....	137
2.4.	La voie rétrograde médiée par EX1/EX2 ne régule pas la MCP chez <i>mips1</i> .. .....	137
2.5.	Les changements redox associés à l'activité des chloroplastes ne sont pas responsables du phénotype de <i>mips1</i> .....	138
2.6.	La MCP chez <i>mips1</i> est supprimée par la voie de signalisation rétrograde du PAP .....	139
2.7.	La signalisation PAP chez <i>mips1</i> .....	140
2.8.	Implication de la mutation <i>fry1-6</i> dans le phénotype d'autres LMM et dans les réponses immunes .....	140
3.	Discussion et perspectives .....	141
	CONCLUSION GENERALE .....	143
	Le crible de supprimeurs : une approche intéressante ? .....	144
	Quelle est la cause de l'induction massive de MCP chez <i>mips1</i> ? .....	144
	L'accumulation de SA, un point de non retour ? .....	146
	Quels sont les acteurs de la MCP chez <i>mips1</i> ? .....	146
	Qu'en est-il des autres phénotypes de <i>mips1</i> ? .....	147
	MATERIEL ET METHODES.....	149
I.	Matériel .....	150
1.	Matériel végétal .....	150
2.	Souches bactériennes.....	150
1.1.	Pour le clonage .....	150
1.2.	Pour la transformation des plantes.....	150
1.3.	Bactéries pathogènes .....	150



3.	Oligonucléotides .....	151
4.	Vecteurs.....	151
5.	Imagerie.....	151
II.	Méthodes .....	152
1.	Conditions et milieux de culture des plantes .....	152
1.1.	Conditions de culture .....	152
1.2.	Stérilisation des graines.....	152
1.3.	Culture des plantes <i>in vitro</i> .....	152
1.4.	Culture des plantes en pot sur terreau .....	152
2.	Phénotypage des plantes .....	153
2.1.	Induction des lésions.....	153
2.2.	Phénotypage des cotylédons.....	153
2.3.	Mesure de la taille des racines principales .....	153
3.	Techniques utilisées pour le génotypage des lignées mutantes .....	154
3.1.	Extraction d'ADN génomique .....	154
3.2.	Génotypage.....	154
4.	Techniques de clonage .....	155
4.1.	Amplification de l'insert par PCR .....	155
4.2.	Ligation vecteur – insert(s) .....	155
4.3.	Le système Gateway® .....	155
4.4.	Transformation des bactéries par électroporation .....	156
4.5.	PCR sur colonies.....	156
4.6.	Extraction d'ADN plasmidique .....	156
4.7.	Digestion des plasmides.....	157
4.8.	Séquençage .....	157
5.	Transformation d'Arabidopsis .....	157
5.1.	Préparation de la suspension d'Agrobactéries.....	157
5.2.	Préparation et transformation des plantes.....	157
5.3.	Sélection des plantes transformantes .....	158
6.	Mesure de l'expression des gènes.....	158
6.1.	Extraction et transcription inverse des ARNs.....	158
6.2.	PCR quantitative .....	158
6.3.	Analyses transcriptomiques.....	159
7.	Cartographie des mutations des supprimeurs .....	159
7.1.	Obtention des lignées recombinantes.....	159



7.2.	Bulk segregant analysis .....	159
7.3.	Extraction d'ADN nucléaire .....	160
7.4.	Séquençage de l'ADN nucléaire issu des lignées recombinantes .....	161
7.5.	Analyse des séquences .....	161
7.6.	Marqueurs CAPS et dCAPS.....	161
8.	Méthodes relatives à la détection de la mort cellulaire.....	162
8.1.	Coloration au bleu de trypan.....	162
8.2.	Mesure de la fuite d'électrolytes.....	162
8.3.	Coloration au DAB .....	162
9.	Dosage de métabolites .....	163
9.1.	Dosage du glutathion .....	163
9.2.	Dosage du SA total, SA libre, scopolétine et camalexine.....	163
9.3.	Métabolome : dosage du MI, galactinol, raffinose et autres .....	164
9.4.	Dosage des phytohormones.....	164
10.	Dosage des activités hexokinase .....	164
11.	Tests de sensibilité à <i>P. syringae</i> .....	165
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....		167
ANNEXES.....		186
Annexe 1. « Supplemental table S1 » de l'article Bruggeman <i>et al.</i> (2014). .....		187
Liste cluster 1.....		187
Liste cluster 2.....		188
Liste cluster 3.....		190
Liste cluster 4.....		192
Annexe 2. Article 4.....		194
“Chloroplasts-derived signals regulate programmed cell death in the Arabidopsis mips1 mutant”. .....		194
Annexe 3. Oligonucléotides utilisés .....		211



## LISTE DES ABREVIATIONS

<b>ABA</b>	Acide Abscissique
<b>ACC</b>	1-AminoCyclopropane-1-Carboxylic-acid
<b>ACD</b>	Accelerated Cell Death
<b>ADN</b>	Acide DésoxyriboNucléique
<b>ADNc</b>	ADN complémentaire
<b>ADN-T</b>	ADN de transfert
<b>ADP</b>	Adénosine DiPhosphate
<b>AIA</b>	Acide Indol-Acétique
<b>AMP</b>	Adénosine 5'-monophosphate
<b>AOS</b>	Allene Oxide Synthase
<b>AOX</b>	Alternative OXydase
<b>ARN</b>	Acide RiboNucléique
<b>ARNm</b>	ARN messenger
<b>ATP</b>	Adénosine TriPhosphate
<b>Avr</b>	Avirulence
<b>BAK1</b>	BRI1-Associated receptor
<b>BET</b>	Bromure d'éthidium
<b>CaM</b>	Calmodulin
<b>CaMV</b>	Virus de la mosaïque du chou-fleur
<b>CAPS</b>	Cleaved Amplified Polymorphic Sequences
<b>CFP</b>	Cyan Fluorescent Protein
<b>cfu</b>	Unité formant une colonie
<b>CNGC</b>	Cyclic Nucleotide-Gated Channels
<b>CO<sub>2</sub></b>	Dioxyde de carbone
<b>COI1</b>	COronatine Insensitive 1
<b>Col-0</b>	Ecotype Columbia-0
<b>CPSF30</b>	Cleavage and Polyadenylation Specificity Factor 30
<b>CTR1</b>	Constitutive Triple Response 1
<b>DAB</b>	3,3-DiAminoBenzidine
<b>dCAPS</b>	derived Cleaved Amplified Polymorphic Sequences
<b>Dnase</b>	Désoxyribonucléase
<b>dNTP</b>	Désoxyribonucléotides triphosphates
<b>DO</b>	Densité Optique
<b>EDS1</b>	Enhanced Disease Susceptibility 1
<b>EDTA</b>	Ethylène diamine tetra acétique
<b>EIN</b>	Ethylene INsensitive
<b>EMS</b>	Ethyl Methyl Sulfonate
<b>EPS</b>	ExoPolySaccharide
<b>ERF1</b>	Ethylene Response Factor 1
<b>ERS</b>	Ethylene Response Sensor





<b>ETH</b>	Ethylène
<b>ETI</b>	Effector-Triggered Immunity
<b>ETR</b>	EThylene Response
<b>EX</b>	EXecuter
<b>F6P</b>	Fructose-6-phosphate
<b>FBR11</b>	Fumonisin B1 Resistant 11
<b>Flg22</b>	Flagelline 22
<b>FLS2</b>	FLagellin Sensing 2
<b>FRY1</b>	FieRY1
<b>G6P</b>	Glucose-6-Phosphate
<b>G6PDH</b>	Glucose-6-phosphate déshydrogénase
<b>GA</b>	Acide gibbéréllique
<b>GC-MS</b>	Chromatographie gazeuse couplée à un spectromètre de masse
<b>Gène R</b>	Gène de Résistance
<b>GFP</b>	Green Fluorescent Protein
<b>GIN2</b>	Glucose-INsensitive2
<b>GR</b>	Glutathion Réductase
<b>GSH</b>	Glutathion réduit
<b>GSSG</b>	Glutathion oxydé
<b>GUN</b>	Genome UNcoupled
<b>H<sub>2</sub>O<sub>2</sub></b>	Peroxyde d'hydrogène
<b>hpi</b>	Heure post-inoculation
<b>HR</b>	Hypersensitive Response
<b>H XK</b>	HeXoKinase
<b>ICS1</b>	IsoChorismate Synthase 1
<b>IMP</b>	Inositol MonoPhosphatase
<b>INO1</b>	INOsitol synthase 1
<b>InsP6</b>	<i>Myo</i> -inositol hexakiphosphate ou phytate
<b>IP<sub>3</sub></b>	Inositol tri-phosphate
<b>IPS</b>	Inositol Phosphate Synthase
<b>JA</b>	Acide jasmonique
<b>JA-Ile</b>	Jasmonic Acid Isoleucine
<b>JAR1</b>	JAsmonate Resistant 1
<b>JAZ</b>	JAsmonate ZIM domain
<b>JC</b>	Jour Court
<b>JL</b>	Jour Long
<b>JMT</b>	Jasmonate Methyl Transferase
<b>Kb</b>	Kilo Base
<b>kDa</b>	Kilo Dalton
<b>LB</b>	Luria Bertani
<b>LCB</b>	Long Chain Base
<b>LMM</b>	Lesion Mimic Mutant
<b>LOH</b>	LAG One Homologue
<b>LRC</b>	Lateral Root Cap



<b>LRR</b>	Leucine Rich Repeat
<b>LSD1</b>	Lesion Simulating Disease1
<b>MAMP</b>	Microbe Associated Molecular Pattern
<b>MAPK</b>	Mitogen Associated Protein Kinase
<b>MAPKK</b>	Mitogen Associated Protein Kinase Kinase
<b>MAPKKK</b>	Mitogen Associated Protein Kinase Kinase Kinase
<b>MeJA</b>	Methyl Jasmonate
<b>MeSA</b>	Methyl Salicylate
<b>MF</b>	Matière Fraîche
<b>MI</b>	<i>Myo</i> -inositol
<b>Mileu MS</b>	Milieu Murashie & Skoog
<b>MIPS</b>	<i>Myo</i> -Inositol-3-Phosphate Synthase
<b>MKS1</b>	MAPK Substrate 1
<b>MPK4</b>	MAP kinase 4
<b>MS</b>	Matière sèche
<b>MTI</b>	MAMP-Triggered Immunity
<b>NAD</b>	Nicotinamide Adénine Dinucléotide
<b>NADH</b>	NAD, forme réduite
<b>NADP</b>	NAD phosphate
<b>NADPH</b>	NAD phosphate, forme réduite
<b>NBS-LRR</b>	Nucleotide-Binding Site Leucine-Rich-Repeat
<b>NO</b>	Nitric Oxyde
<b>NPR</b>	Non expresser of PR genes
<b>O<sub>2</sub></b>	Dioxygène
<b>O<sub>2</sub><sup>-</sup></b>	Anion superoxyde
<b>O<sub>2</sub><sup>1</sup></b>	Oxygène singulet
<b>PAD4</b>	PhytoAlexin Deficient 4
<b>PAMP</b>	Pathogen Associated Molecular Pattern
<b>PAP</b>	5'-PhosphoAdénosine-3'-Phosphate
<b>PAPS1</b>	Poly(A) Polymerase 1
<b>Pb</b>	Paire de bases
<b>PBA1</b>	20S Proteasome $\beta$ subunit 1
<b>PCB2</b>	Pale green and Chlorophyll B reduced 2
<b>PCR</b>	Polymerase Chain Reaction
<b>PCRq</b>	PCR quantitative
<b>PDF1.2</b>	Plant Defensine 1.2
<b>Pi</b>	Phosphate inorganique
<b>Ppm</b>	Partie par million
<b>PR</b>	Pathogenesis Related
<b><i>Pst</i></b>	<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>tomato</i>
<b>PTI</b>	PAMP-Triggered Immunity
<b>pv.</b>	Pathovar
<b>qsp</b>	Quantité suffisante pour
<b>RE</b>	Réticulum Endoplasmique



<b>RLK</b>	Receptor Like Kinase
<b>RLP</b>	Receptor Like Protein
<b>ROS</b>	Espèces réactives de l'oxygène
<b>RPM1</b>	Resistance to <i>P.syringae</i> pv Maculicola 1
<b>RT</b>	Reverse transcription
<b>SA</b>	Acide Salicylique
<b>SAG</b>	Salicylic Acid Beta-Glucoside
<b>SAL</b>	Acide salicylique libre
<b>SAM</b>	S-AdénosylMethionine
<b>SAR</b>	Systemic Acquired Resistance
<b>SCF</b>	Skp Cullin F-box containing
<b>SiARN</b>	Short Interferant ARN
<b>SID2 (=ICS1)</b>	SA Induction Deficient 2
<b>SNP</b>	Single Nucleotid Polymorphism
<b>SOD</b>	SuperOxyde Dismutase
<b>SOMI</b>	Suppressor Of MIPs1
<b>TAIR</b>	The Arabidopsis Information Resource
<b>TIR-NBS-LRR</b>	Toll-Interleukin-1 Receptor Nucleotide-Binding site Leucine-Rich-Repeat
<b>TRIS</b>	Tris (hydroxyméthyl) aminométhane
<b>UBQ10</b>	UBiQuitin 10
<b>UV</b>	Ultra violet
<b>VLCFA</b>	Very Long Chain Fatty Acid
<b>VND</b>	Vascular related Nac Domain
<b>VPE</b>	Vacuolar Processing Enzyme
<b>VTC4</b>	ViTamin C 4
<b>Ws</b>	Wassilewskija
<b>XPO1b</b>	eXPortin 1b
<b>XRN</b>	eXo-RiboNucléases
<b>ZEN1</b>	Zinia EndoNuclease 1



Abréviation	Nom complet	Abréviation	Nom complet
GolS	Galactinol Synthase	PI4K	Phosphatidylinositol-(4)-phosphate Kinase
GIPC	Glycosyl-inositolphosphorylceramide	PIP3K	Phosphatidylinositol-phosphate-3 kinase
IMS	IAA- <i>myo</i> -inositol synthase	PIP4K	Phosphatidylinositol-phosphate-4 kinase
IMT	Inositol méthyl transférase	PIP5K	Phosphatidylinositol-phosphate-5 kinase
Ins	<i>Myo</i> -inositol	PIS	Phosphatidylinositol synthase
Ins(3)P <sub>1</sub>	D- <i>myo</i> -inositol-3-phosphate ou L- <i>myo</i> -inositol-1-phosphate	PLC	Phospholipase C
InsP <sub>2</sub>	<i>Myo</i> -inositol bisphosphate	PtdIns	Phosphatidylinositol
InsP <sub>3</sub>	<i>Myo</i> -inositol trisphosphate	PtdIns(3)P <sub>1</sub>	Phosphatidylinositol(3)-phosphate
InsP <sub>4</sub>	<i>Myo</i> -inositol tetrakiphosphate	PtdIns(3,4)P <sub>2</sub>	Phosphatidylinositol(3,4)-bisphosphate
InsP <sub>5</sub>	<i>Myo</i> -inositol pentakiphosphate	PtdIns(3,5)P <sub>2</sub>	Phosphatidylinositol(3,5)-bisphosphate
InsP <sub>6</sub>	<i>Myo</i> -inositol hexakiphosphate ou phytate	PtdIns(4)P <sub>1</sub>	Phosphatidylinositol(4)-phosphate
InsP <sub>7</sub>	<i>Myo</i> -inositol pyrophosphate	PtdIns(4,5)P <sub>2</sub>	Phosphatidylinositol(4,5)-bisphosphate
IPK2	Inositolpolyphosphate kinase	PtdIns(5)P <sub>1</sub>	Phosphatidylinositol(5)-phosphate
MI	<i>Myo</i> -inositol		
MIK	<i>Myo</i> -inositol kinase		
MIOP	MI <i>oxydation pathway</i> ; voie d'oxydation du MI		
MIOX	<i>Myo</i> -inositol oxygénase		
Phosphoinositide	Terme désignant un phosphatidylinositol phosphate		
Phytate	<i>Myo</i> -inositol hexakiphosphate (InsP <sub>6</sub> )		
PI3K	Phosphatidylinositol-(3)-phosphate Kinase		

Tableau 1. Abréviations concernant le *myo*-inositol et ses dérivés.





# INTRODUCTION



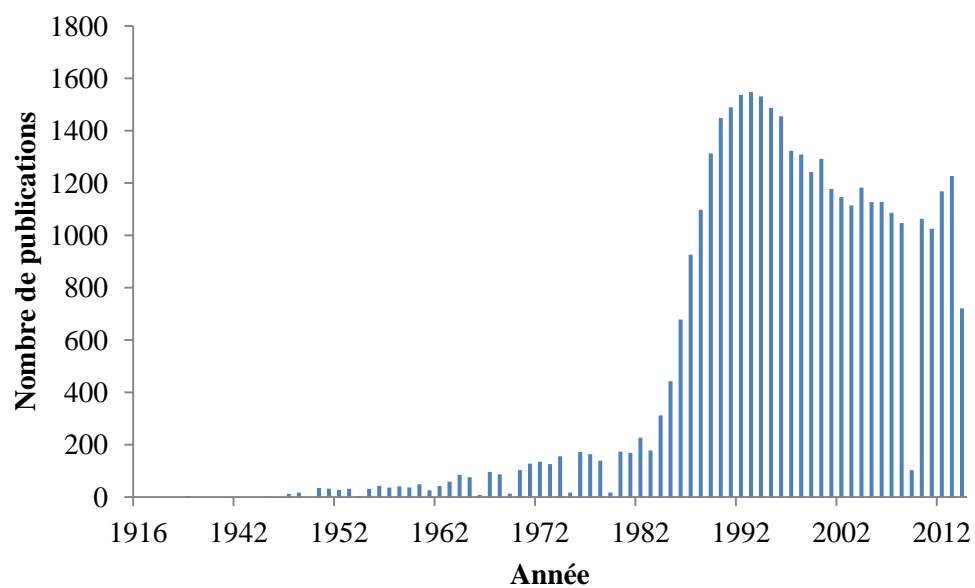
## Avant-propos

Les travaux de ma thèse se sont insérés dans un projet scientifique visant à comprendre le rôle de l'enzyme MIPS1 (*myo*-inositol-3-phosphate synthase) dans les mécanismes conduisant à la Mort Cellulaire Programmée (MCP) chez *Arabidopsis thaliana*. Il s'agit d'une enzyme du métabolisme primaire agissant dans la synthèse du *myo*-inositol, un petit composé impliqué dans un grand nombre de fonctions au sein des cellules végétales. Ainsi, ce chapitre d'introduction se divise en trois parties :

- Dans un premier temps, j'aborderai les diverses fonctions du *myo*-inositol dans la plante à travers la description de cette molécule et de ses nombreux dérivés. Je me focaliserai également sur les enzymes MIPS, et plus particulièrement MIPS1 chez *Arabidopsis*, pour en détailler les rôles connus au sein des cellules végétales.

- Dans un second temps, je présenterai les caractéristiques majeures de la MCP et de ses fonctions chez les plantes. Les mécanismes moléculaires impliqués dans la réponse hypersensible (HR), une forme de MCP, seront ensuite plus particulièrement détaillés. Pour cela, les différents processus cellulaires régulant la MCP au cours de la HR seront abordés à travers les découvertes réalisées grâce aux « lesion mimic mutants », puis les voies hormonales impliquées seront abordées.

- Dans la troisième partie, il sera précisé la problématique scientifique dans laquelle ma thèse s'est insérée et les objectifs établis pour y répondre.



**Figure 1. Nombre de publications par an, de 1916 à 2014, dont le sujet d'étude présente une relation plus ou moins proche avec le *myo*-inositol.**

Afin d'obtenir ce graphique, une recherche avec le mot clé « *myo*-inositol » a été effectuée en utilisant *Pubmed* ([www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed)), une base de données bibliographiques de l'ensemble des domaines de la biologie.

## I. *Myo*-inositol : fonctions et origine dans la plante

C'est en 1850 que le chimiste allemand Johann Joseph Scherer isola, à partir de muscles cardiaques, un composé qu'il nomma inositol. Cent cinquante ans et plusieurs milliers de publications plus tard (Figure 1), nous savons maintenant que l'inositol, dont la forme majoritaire est le *myo*-inositol, est un composé ubiquitaire présent chez les eucaryotes, les bactéries et les archées (Michell 2008). Chez les mammifères, l'altération de l'homéostasie du *myo*-inositol est un facteur impliqué dans le trouble bipolaire (Shaltiel *et al.* 2004), dans des maladies neurodégénératives telles que les maladies d'Alzheimer (Miller *et al.* 1993), de Huntington et de Parkinson (Sarkar *et al.* 2005) pouvant aller jusqu'à provoquer la mort de jeunes souriceaux (Buccafusca *et al.* 2008). En plus d'un rôle évident dans les fonctions neuronales (Fisher *et al.* 2002), le *myo*-inositol est également important lors de la reproduction (Papaleo *et al.* 2009) et du développement embryonnaire (Hynes *et al.* 2000).

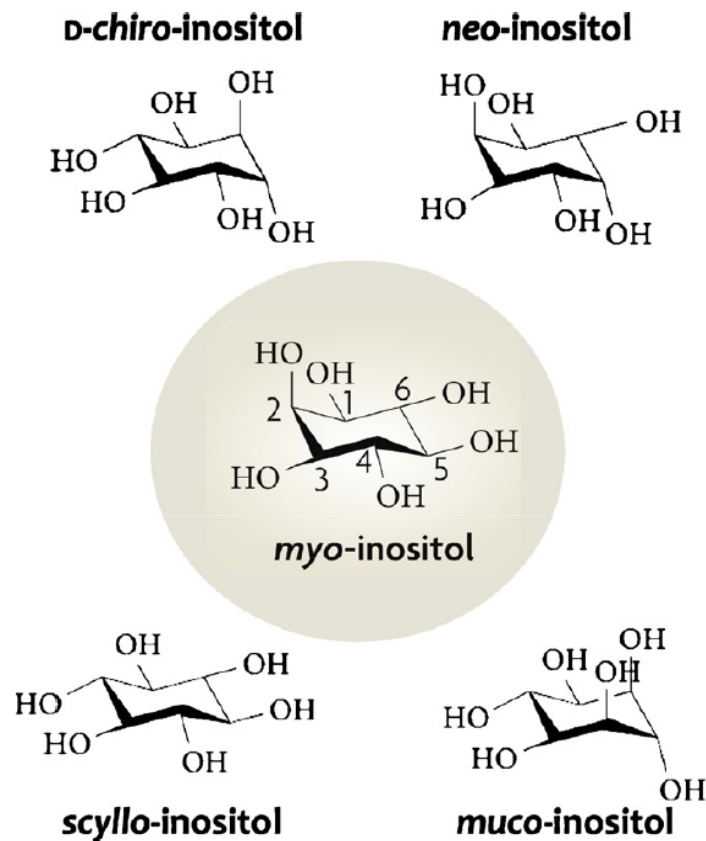
Etant donné que l'étude du métabolisme du *myo*-inositol et de ses fonctions dans le vivant est un immense champ de connaissances, attesté par le nombre considérable de publications annuelles sur le sujet (Figure 1), je ne détaillerai ses rôles que chez les plantes, notre modèle d'étude. Cette première partie ne vise pas à faire un état des lieux exhaustif du domaine d'action du *myo*-inositol chez les végétaux, mais plutôt de donner au lecteur un aperçu de l'importance de cette molécule dans la vie des organismes photosynthétiques, afin de mieux appréhender mes travaux de thèse.

### 1. Le *myo*-inositol libre

Le *myo*-inositol est le précurseur d'une grande variété de molécules dans la cellule (§2.). Afin d'aborder différents aspects concernant ces dérivés, il est nécessaire de comprendre la structure et les propriétés chimiques du *myo*-inositol (§1.1.) ainsi que ses fonctions dans la plante à l'état libre (§1.2).

#### 1.1. Structure et propriétés chimiques

L'inositol, ou cyclohexanehexol, appartient à un grand groupe de molécules nommées polyol, ou polyalcool, caractérisé par la présence d'un certain nombre de groupes hydroxyles (-



**Figure 2. Les stéréoisomères de l'inositol identifiés chez les plantes (d'après Valluru and Van den Ende 2011).**

Chez les plantes, 6 stéréoisomères de l'inositol ont été identifiés (le *chiro*-inositol existe sous les formes *D-chiro* et *L-chiro*). Le *myo*-inositol est de très loin la forme majoritaire dans les cellules végétales. Les molécules sont représentées en conformation chaise et les 6 carbones du MI sont numérotés. Cette numérotation permet de positionner les molécules liées au MI, formant des dérivés. Par exemple, dans le PtdIns(4,5)P<sub>2</sub> (pour le nom complet voir le tableau 1) les 2 phosphates sont liés au niveau des carbones 4 et 5.

OH). Le sorbitol ou encore le mannitol, additifs couramment utilisés dans l'industrie agroalimentaire, sont également des polyols. Du fait de sa structure cyclique à six carbones (Figure 2), l'inositol fait partie d'une sous-classe de polyols : les cyclitols, molécules circulaires composées d'au moins trois atomes de carbone, dont chacun porte un groupe hydroxyle. Grâce aux propriétés chimiques de ces hydroxyles, formant facilement des liaisons avec d'autres atomes, l'inositol a la possibilité de se lier avec un grand nombre de molécules et de rentrer ainsi dans la composition de nombreux constituants cellulaires.

L'inositol, de formule brute  $C_6H_{12}O_6$ , présente neuf stéréoisomères qui se distinguent par des variations dans la position des groupements hydroxyles. Sept stéréoisomères sont connus pour être présents dans la nature dont six ont été identifiés dans les plantes (Valluru and Van den Ende 2011). Si les *myo*-, *chiro*- et *scyllo*-inositols constituent les stéréoisomères les plus abondants chez les végétaux (Figure 2), le *myo*-inositol est de loin le plus abondant, tous organismes confondus, et occupe une position centrale dans le métabolisme de l'inositol (Loewus and Murthy 2000).

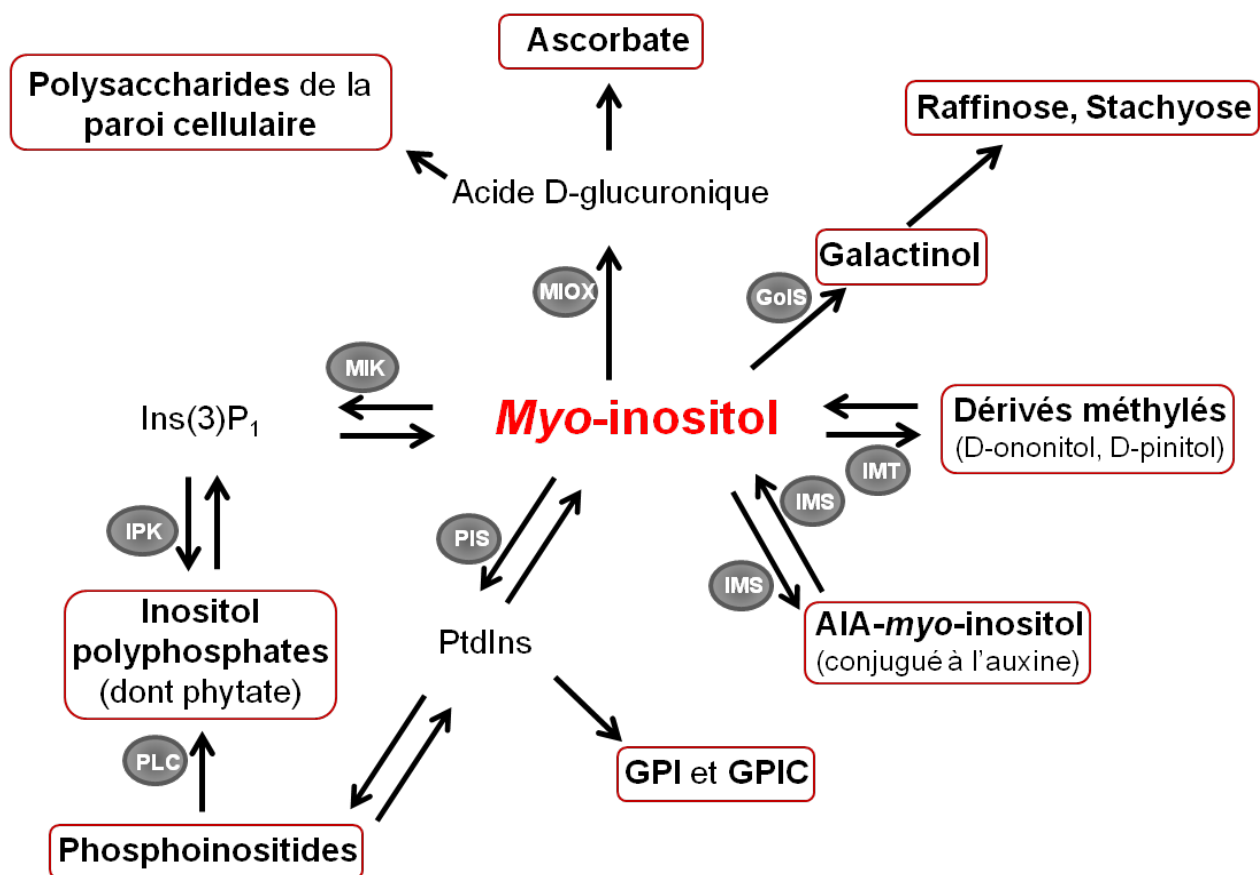
Traiter du métabolisme de l'inositol ou du *myo*-inositol est donc quasiment équivalent. Pour plus de clarté, uniquement le terme de « *myo*-inositol » sera utilisé par la suite et seulement les fonctions et les dérivés qui lui sont inhérents seront traités. Le mot *myo*-inositol pourra également être abrégé en « MI »<sup>1</sup>.

## 1.2. Fonctions du *myo*-inositol libre dans la plante

La ficoïde glaciale, *Mesembryanthemum crystallinum*, est une plante de la famille des Aizoacées, originaire du sud-est africain, qui en cas d'excès de sel dans son environnement le stocke au sein de ses vacuoles. Il a été montré chez cette espèce, que en cas de stress salin, le MI libre servirait de molécule signal, voyageant des feuilles aux racines, afin d'induire l'absorption de sodium par celles-ci (Nelson *et al.* 1999). Ces travaux sont presque les seuls à rapporter une fonction directe du MI libre dans la plante. En effet, étant donné que le MI peut être très rapidement métabolisé pour former de nombreux dérivés (§2.1.), il est très difficile de savoir si l'effet considéré est imputable directement au MI ou indirectement à ses dérivés. Ainsi, évoquer les fonctions du MI dans la plante, revient dans la majorité des cas à considérer les fonctions de ses dérivés. La partie suivante (§2) donne une vue d'ensemble des différentes molécules issues du MI et décrit certains de leurs rôles.

<sup>1</sup> On peut noter cependant que selon la nomenclature internationale une molécule comportant de l'inositol présente dans son nom l'abréviation « Ins », comme l'InsP<sub>6</sub> par exemple, alors que cet inositol correspond formellement à du *myo*-inositol. Donc les abréviations « MI » et « Ins » sont équivalentes, et toutes deux se réfèrent au *myo*-inositol.





**Figure 3. Schéma simplifié des différents dérivés du *myo*-inositol et de leur biosynthèse chez les plantes.**

Les principales enzymes impliquées dans la biosynthèse de ces dérivés sont également indiquées. Les doubles flèches indiquent que la réaction peut être catalysée dans les deux sens soit par la même enzyme soit par deux enzymes différentes. Une seule flèche indique que la réaction est à sens unique.

GoIS : Galactinol synthase ; GPI : Glycosyl-phosphatidylinositol ; GPIC : Glycosyl-inositolphosphorylceramide ; IMS : IAA-myoinositol synthase ; IMS : *myo*-Inositol méthyl transférase ; IPK : Inositolpolyphosphate kinase ; MİK : Myo-inositol kinase ; PIS : Phosphatidylinositol synthase ; PLC : Phospholipase C.

## 2. Les dérivés du *myo*-inositol

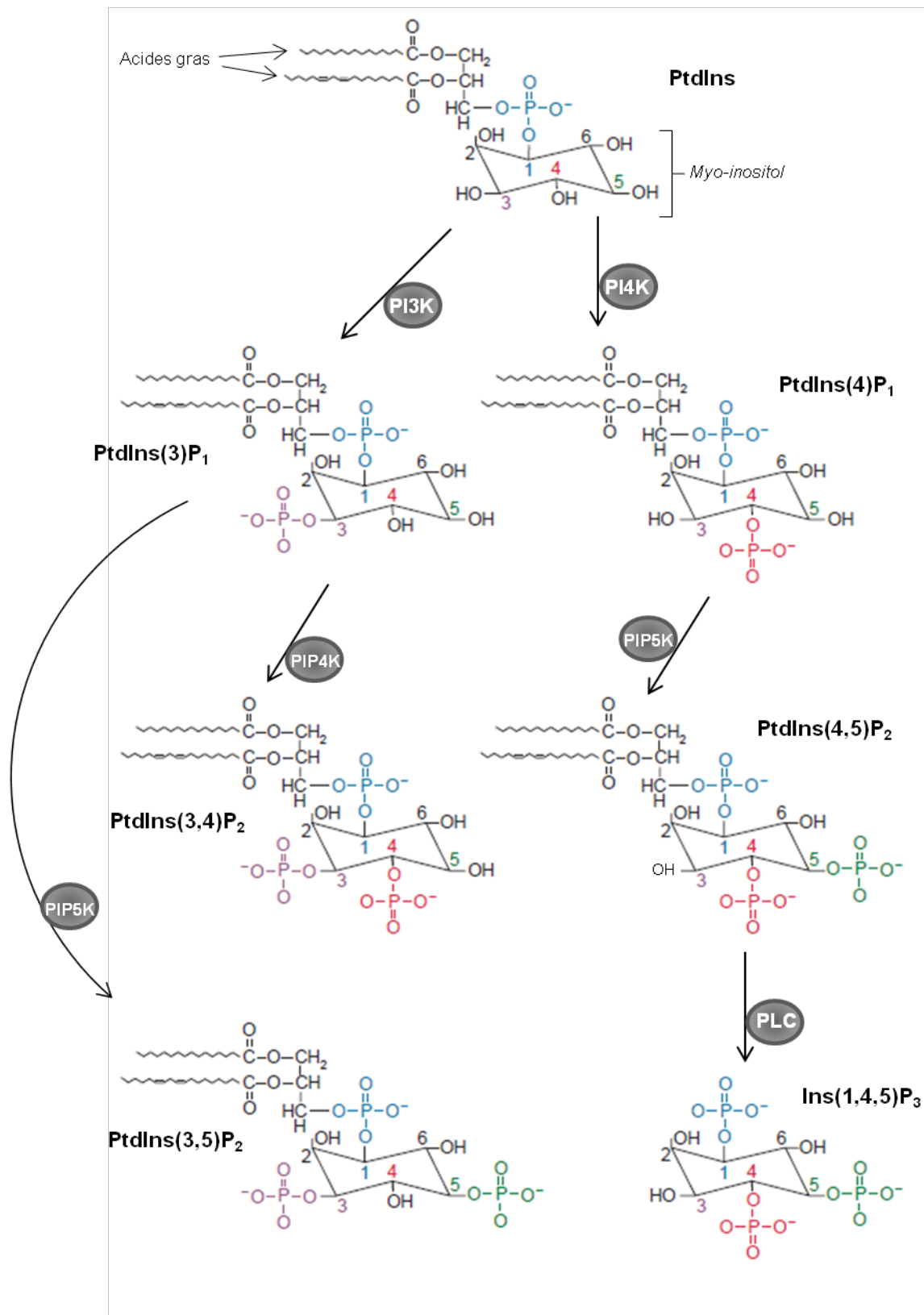
A ce jour, environ 40 dérivés du MI ont pu être identifiés (Valluru and Van den Ende 2011), ce qui implique potentiellement autant de fonctions cellulaires différentes associées à une quarantaine de noms de molécules. Bien qu'ils ne soient pas tous évoqués pour plus de clarté, le Tableau 1 regroupe les noms et les abréviations des dérivés mentionnés ici.

### 2.1. Biosynthèse des dérivés du *myo*-inositol

En fonction des molécules avec lesquelles le MI est couplé, ses dérivés peuvent être classés en sept groupes (Figure 3) : les **phosphoinositides** ; les **Glycosyl-Phosphatidylinositols** (GPI) et **Glycosyl-InositolPhosphorylCeramides** (GIPC) ; les **inositols polyphosphates** ; les **dérivés de la voie d'oxydation** du MI (ou « MI Oxydation Pathway » - **MIOP**) ; le **galactinol**, **raffinose**, et **stachyose** ; les **dérivés méthylés** ; l'**AIA-*myo*-inositol**, **conjugué à l'auxine**.

La réaction catalysée par la Phosphatidylinositol Synthase (PIS) est la porte d'entrée du MI dans le monde des lipides. En effet, cette enzyme permet la liaison entre le MI et un glycérophospholipide, produisant ainsi du Phosphatidylinositol (PtdIns). Au sein des cellules végétales, ce composé représente entre 15 et 20% des phospholipides de la membrane plasmique et de la membrane externe des mitochondries (Drobak 1993). S'il n'est pas utilisé tel quel comme constituant membranaire, le PtdIns peut servir à générer deux groupes de dérivés du MI :

- Des kinases peuvent phosphoryler jusqu'à trois des cinq groupes hydroxyles (liés aux carbones 3, 4 et 5) disponibles sur le MI du PtdIns, produisant des molécules variées qui diffèrent entre elles par la position et le nombre de phosphates. Ces formes phosphorylées du PtdIns sont appelées **phosphoinositides** (Figure 3). Six phosphoinositides différents ont été identifiés chez *Arabidopsis* (Mueller-Roeber and Pical 2002) : le PtdIns(3)-phosphate (PtdIns(3)P<sub>1</sub>) ; le PtdIns(4)P<sub>1</sub> ; le PtdIns(3,5)-bisphosphate (PtdIns(3,4)P<sub>2</sub>) ; le PtdIns(3,5)P<sub>2</sub> ; le PtdIns(4,5)P<sub>2</sub> ; le PtdIns(5)P<sub>1</sub>. Bien qu'il existe chez les animaux, le PtdIns(3,4,5)-trisphosphate (PtdIns(3,4,5)P<sub>3</sub>) n'a pas été identifié chez les plantes (Mueller-Roeber and Pical 2002). Grâce à leur caractéristique amphipathique, ces composés peuvent traverser à la fois des environnements hydrophiles et hydrophobes, ce qui leur permet d'être de bons messagers intra- et intercellulaires (Boss and Im 2012).



**Figure 4. Structure et biosynthèse des phosphoinositides présents chez les plantes, et de l'Ins(1,4,5)P<sub>3</sub> (modifié d'après Stevenson *et al.* 2000).**

Le PtdIns(5)P<sub>1</sub> n'est pas représenté sur cette figure mais existe bien chez les plantes (Ndamukong *et al.* 2010). Voir Tableau 1 pour les abréviations.

- Le PtdIns peut également être glycosylé pour former du **GPI**, ou servir de « donneur » de MI qui peut alors être placé sur la « tête » d'un phosphorylceramide (un sphingolipide), molécule généralement glycosylée par la suite, produisant du **GIPC**. Ces lipides glycosylés ont la possibilité d'être liés à des protéines, leur servant ensuite d'ancrage aux membranes cellulaires (Loewus and Murthy 2000).

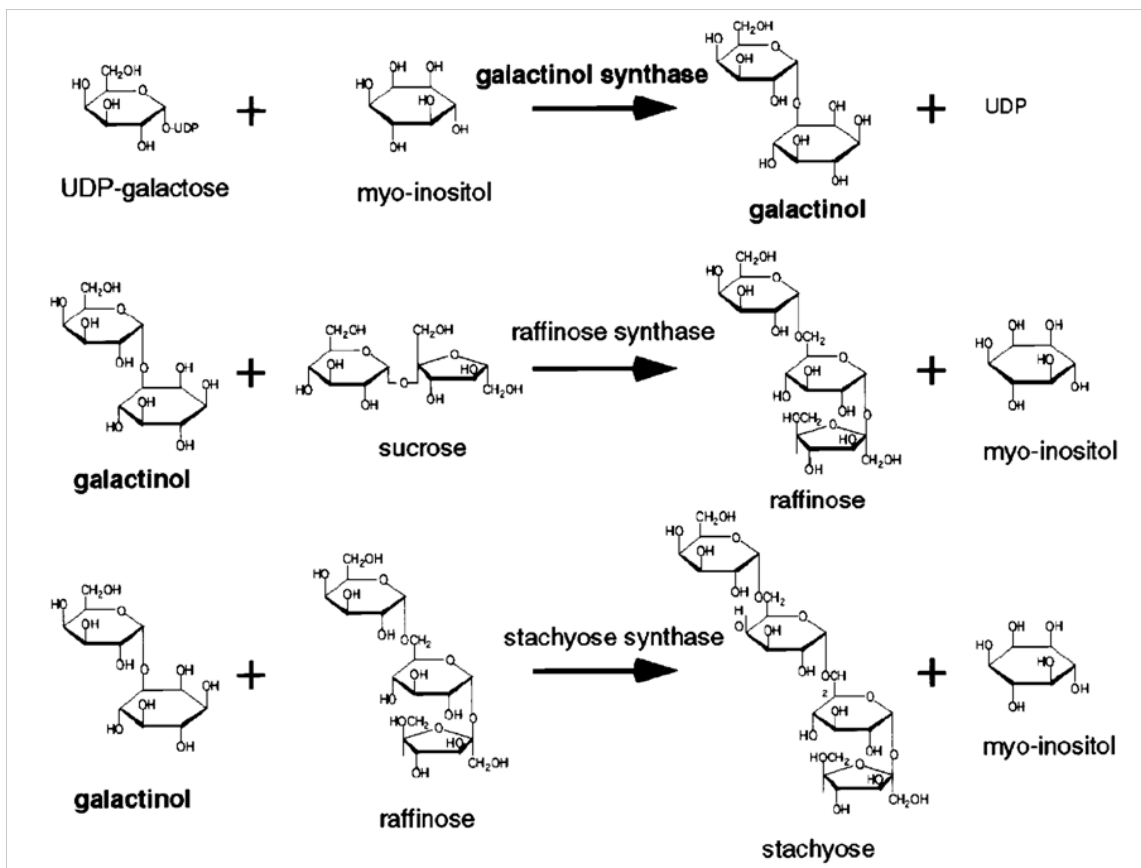
Les **inositols polyphosphates** sont des formes plus ou moins phosphorylées du MI. Ces dérivés solubles présentent tous les niveaux de phosphorylation rendus possibles grâce aux six groupes hydroxyles du MI, allant de la biphosphorylation à l'hexakiphosphorylation et même à des formes pyrophosphorylées (deux phosphates sont liés ensemble). Jusqu'à la pentaphosphorylation, et en fonction de la kinase synthétisant la molécule, la position des phosphates sur le MI peut varier, créant ainsi une grande diversité d'inositols polyphosphates (Valluru and Van den Ende 2011). Pour cela, les numéros des carbones liés à un phosphate sont rarement spécifiés dans les noms des molécules, qui sont intitulés ainsi: InsP<sub>2</sub>, InsP<sub>3</sub>, InsP<sub>4</sub>, InsP<sub>5</sub>, InsP<sub>6</sub> (ou phytate) et InsP<sub>7</sub>. Il existe deux voies possibles pour synthétiser les inositols polyphosphates (Figure 3 et 4) :

- La voie dépendante des lipides, dans laquelle les phosphoinositides PtdIns(4,5)P<sub>2</sub> ou PtdIns(4)P<sub>1</sub> sont hydrolysés par des PhosphoLipases C (PLC), générant ainsi du InsP<sub>3</sub> ou du InsP<sub>2</sub> (Figure 3), respectivement. Ces molécules servent ensuite de bases pour des inositols polyphosphates plus fortement phosphorylés.

- La voie indépendante des lipides utilise directement l'Ins(3)P<sub>1</sub> (biosynthèse de ce composé expliquée dans §3.) pour produire de l'InsP<sub>2</sub>, qui peut être successivement phosphorylé par des InositolPolyphosphate Kinase (IPK) pour former les autres inositols polyphosphates.

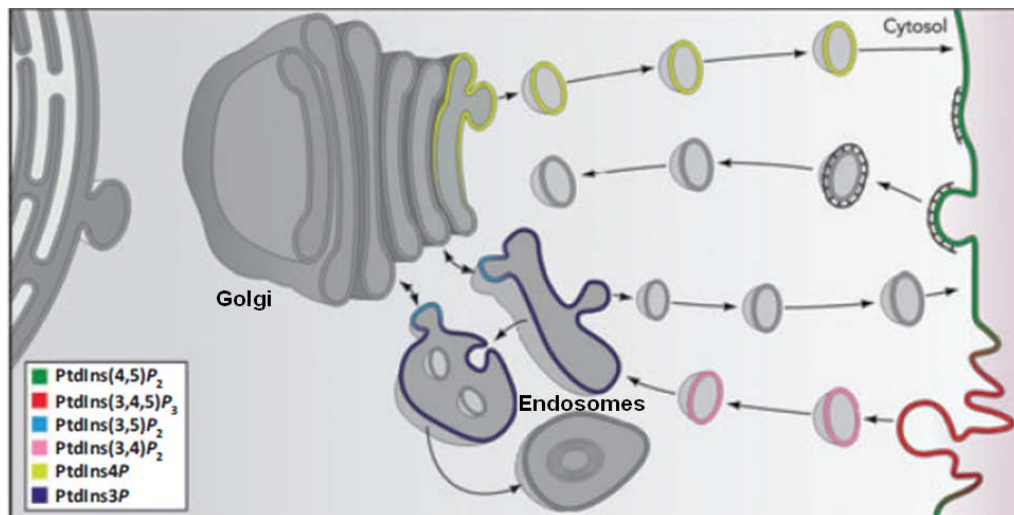
Dans la **voie d'oxydation du MI (MIOP)**, des enzymes nommées MIOX, pour MI OXygénases, convertissent le MI en acide D-glucuronique (Figure 3). Ce composé peut être à la fois utilisé pour la synthèse des **polysaccharides de la paroi cellulaire** (Loewus *et al.* 1962), et d'**ascorbate** (Lorence *et al.* 2004), une molécule antioxydante, régulant l'état oxydo-réducteur de la cellule. Il faut toutefois noter que d'autres voies de biosynthèse, par exemple celles de l'UDP-Glucose et du GDP-D-Mannose, sont respectivement impliquées dans la biosynthèse des polysaccharides de la paroi et de l'ascorbate, et que la voie MIOP semble avoir un rôle mineur (Endres and Tenhaken 2009, Sharples and Fry 2007).

En couplant le MI avec un galactose, les enzymes Galactinol Synthases (GolS) initient une voie de biosynthèse d'oligosacharides solubles (Karner *et al.* 2004) : le **raffinose** et le **stachyose** (Figure 5).



**Figure 5. Biosynthèse du galactinol, du raffinose et du stachyose (d'après Taji *et al.* 2002)**

Le MI est couplé à l'UDP-galactose pour formé du galactinol. Ce composé est ensuite utilisé pour fabriquer du raffinose et du stachyose. On peut remarquer que la synthèse de ces deux dérivés induit la production de MI libre.



**Figure 6. Répartition cellulaire des phosphoinositides lors du trafic membranaire chez les animaux (d'après Michell 2013).**

Les phosphoinositides jouent un rôle essentiel dans le trafic membranaire. Chacun de ces dérivés se retrouve préférentiellement au sein de membranes vésiculaires issus du Golgi (PtdIns(4)P<sub>1</sub>), de la membrane plasmique et de la formation de vésicules d'endocytose (PtdIns(4,5)P<sub>2</sub>), de vésicules formées lors de phagocytose (PtdIns(3,4,5)P<sub>3</sub>, PtdIns(3,4)P<sub>2</sub>), ou encore d'endosomes (PtdIns(3)P<sub>1</sub>, PtdIns(3,5)P<sub>2</sub>). Pour rappel, le PtdIns(3,4,5)P<sub>3</sub> n'a jamais été identifié chez les plantes.

Les *myo*-Inositols Méthyl Transférases (IMT) sont à l'origine de **dérivés méthylés du MI**, le D-ononitol puis le D-pinitol, molécules également solubles.

Enfin, la liaison du MI avec l'Acide Indole-3-Acétique (AIA) produit une des formes conjuguées de l'auxine (Figure 3). L'AIA est dans un premier temps lié à l'UDP-glucose puis le MI y est lié par une AIA-*myo*-inositol synthase (« *IAA-Myo-Inositol Synthase* » - IMS) pour former de l'AIA-*myo*-inositol. L'IMS est une enzyme très peu étudiée chez les plantes. Seul un travail mené chez le maïs (*Zea Mays*), a permis de mettre en évidence l'existence d'une protéine présentant une activité IMS (Kowalczyk *et al.* 2003). De manière intéressante, l'enzyme peut également réaliser la réaction inverse, séparant le MI de l'auxine.

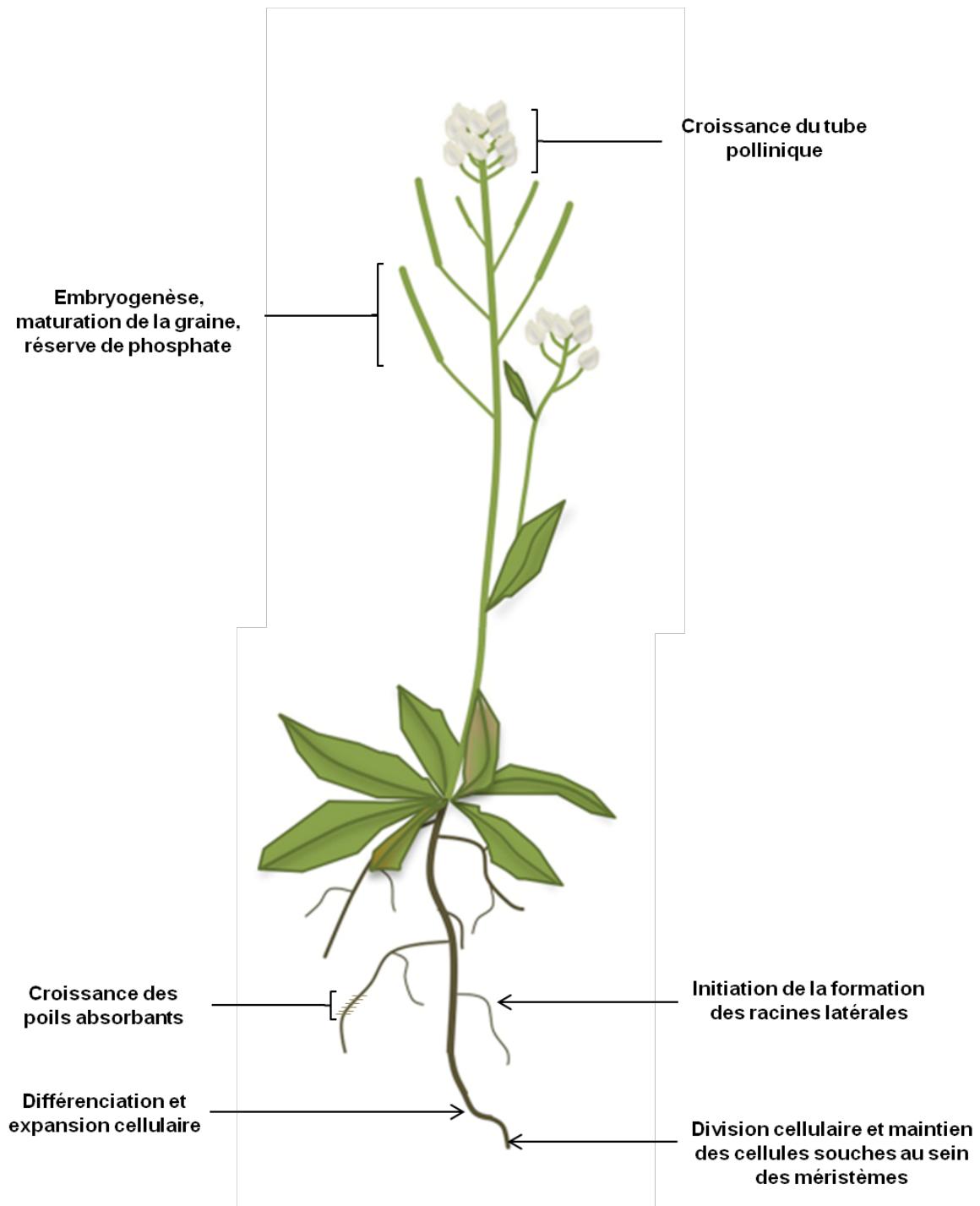
*Le MI est donc à l'origine d'une très grande diversité de molécules, que ce soit dans leurs structures et leurs propriétés physico-chimiques, que dans leurs voies de biosynthèse. Ceci offre la possibilité aux dérivés du MI d'agir au sein de processus très variés donnant ainsi à ce « myo-inositolome » une importance cruciale dans la vie de la plante.*

## **2.2. Fonctions des dérivés du *myo*-inositol dans la plante**

Les effets de molécules à l'échelle d'un tissu, d'un organe ou d'un organisme sont majoritairement les résultats d'actions aux niveaux cellulaires et moléculaires. Les rôles des dérivés du MI seront donc abordés dans un premier temps au niveau cellulaire (§2.2.1.), puis nous verrons leurs fonctions dans la croissance et le développement des plantes (§2.2.2.), dans la réponse face aux stress abiotiques (§2.2.3.) et lors des interactions avec des pathogènes (§2.2.4.).

### **2.2.1. Au niveau cellulaire**

De par leur composition et leur structure, les phosphoinositides, les GPI et les GIPC peuvent s'intégrer aux bicouches lipidiques dans la cellule. La synthèse de ces composés est initiée dans le réticulum endoplasmique et s'achève dans le golgi, où ils acquièrent leurs caractéristiques propres (Markham *et al.* 2013, Michell 2008). A partir de ce compartiment, il est bien connu, chez les animaux, que les phosphoinositides participent au trafic membranaire. Il semble que ces dérivés du MI soient plus particulièrement impliqués dans l'endocytose, l'exocytose ou la phagocytose (Figure 6) (Michell 2013). Chez les plantes, le rôle des phosphoinositides dans le trafic membranaire a également été démontré (Heilmann 2009), et les GPIs, en servant d'ancrage membranaire à des protéines, sont impliqués dans la mise en place de la polarité cellulaire (Fischer *et al.* 2004).



**Figure 7. Les fonctions de dérivés du MI au cours du développement des plantes (dessin issu de <http://sites.dartmouth.edu/guerinot-lab>).**

Lors du développement des plantes (ici *A. thaliana*), les dérivés du MI possèdent de nombreuses fonctions telles que le maintien des cellules souches et le contrôle des divisions cellulaires au sein des méristèmes, la formation des racines latérales, la croissance polarisée des poils absorbants et du tube pollinique ou encore le développement et la maturation de la graine.

Hormis son rôle dans le trafic membranaire (Heilmann 2009), le PtdIns(4,5)P<sub>3</sub> peut être hydrolysé par la PhosphoLipase C (PLC), libérant ainsi du Ins(1,4,5)P<sub>3</sub>, un InsP<sub>3</sub> bien connu pour être un second messenger cellulaire. Chez les animaux, il induit le relargage cytosolique du calcium situé dans le réticulum endoplasmique. Ce calcium active ensuite des cibles comme les calmodulines, qui induisent alors des réponses cellulaires telles que la stimulation de l'expression de gènes, de l'exocytose ou encore de la division cellulaire (Putney 2009). Dans le règne végétal, l'InsP<sub>3</sub> semble avoir conservé sa fonction de messenger (Gillaspy 2011). Chez les plantes cependant le calcium serait d'origine vacuolaire (Peiter 2011), et l'InsP<sub>6</sub>, pouvant provenir de l'InsP<sub>3</sub>, serait également capable d'agir sur le transport du calcium (Lemtiri-Chlieh *et al.* 2003).

D'autre part, du fait de leurs caractéristiques structurales, les phosphoinositides et les inositols polyphosphates peuvent interagir spécifiquement avec certaines protéines et moduler ainsi leur activité (Cullen *et al.* 2001). Grâce à la multitude des cibles, ces dérivés ont un rôle dans de nombreux processus cellulaires : ils régulent par exemple des fonctions nucléaires telles que la transcription, le remodelage de la chromatine, ou encore la réplication de l'ADN (Dieck *et al.* 2012).

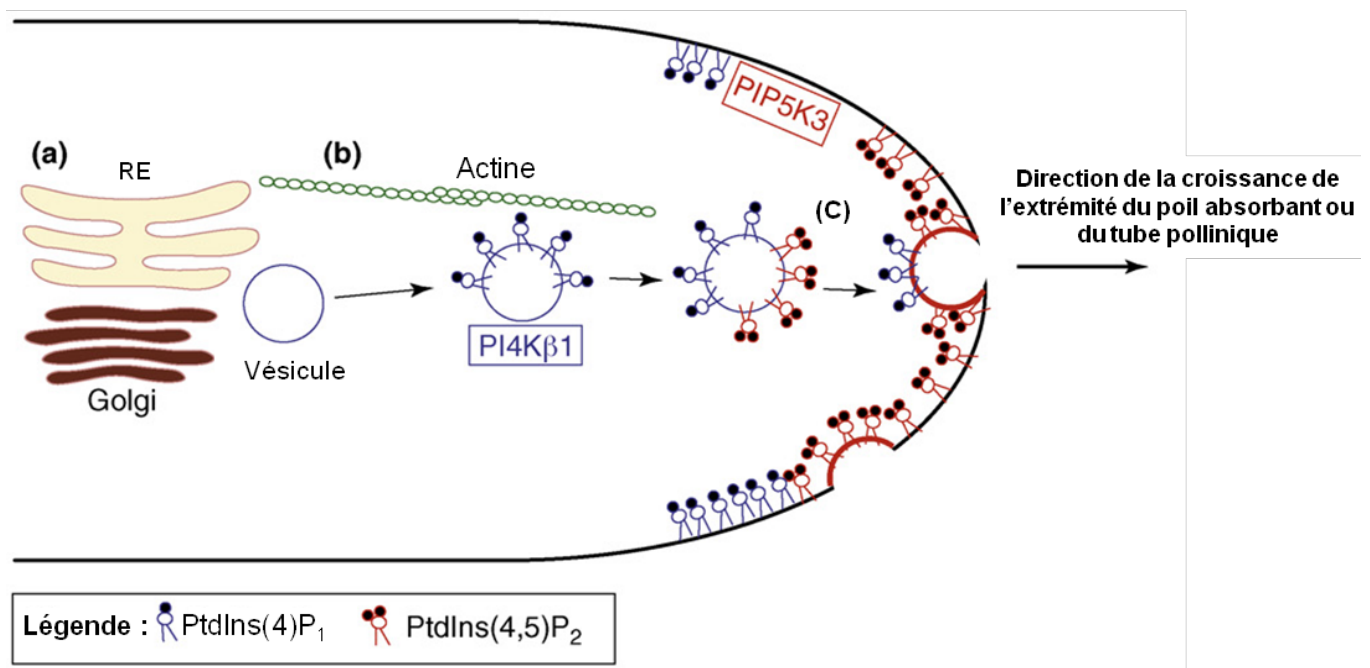
Le galactinol, le raffinose et les dérivés méthylés sont des molécules solubles participant à la régulation de l'osmolarité dans la cellule (den Ende 2013). De plus, outre le fait que l'ascorbate est un antioxydant bien connu et un dérivé possible du MI, il semblerait que le raffinose soit également capable de détoxifier des espèces réactives de l'oxygène (*Reactive Oxygen Species* en anglais ; ROS), tel que le radical hydroxyle (Nishizawa *et al.* 2008).

*Au regard des nombreuses fonctions cellulaires dans lesquelles les dérivés du MI sont impliqués, ces molécules ont la possibilité de jouer des rôles durant toute la vie de la plante, que ce soit lors de son développement ou lorsqu'elle fait face à des stress biotiques et abiotiques (Figure 7).*

### **2.2.2. Au cours du développement de la plante**

Le premier organe qui sort de la graine en germination est la racine. Dans le but d'absorber l'eau et les sels minéraux du sol, cet organe est capable de différencier de nombreuses ramifications, les racines latérales, et des cellules spécialisées, les poils absorbants. L'initiation des racines latérales est liée à une augmentation locale de la concentration en auxine. Un transport actif et contrôlé de cette phytohormone est donc essentiel. Il implique l'action de certains transporteurs spécifiques appartenant à la famille des protéines PIN (Krecek *et al.* 2009). Il a été





**Figure 8. Modèle expliquant le rôle du PtdIns(4)P<sub>1</sub> et du PtdIns(4,5)P<sub>2</sub> dans la croissance polarisée du poil absorbant chez *A. thaliana* (modifié d'après Heilmann 2009).**

Les vésicules de sécrétion sont formées au niveau du golgi (a) et migrent le long de filaments d'actine (b) jusqu'à l'extrémité du poil absorbant où elles fusionnent avec la membrane plasmique (c). La PI4Kβ1, synthétisant le PtdIns(4)P<sub>1</sub>, est associée aux vésicules ce qui suggère que ce dérivé intervient dans leur composition. Le PtdIns(4)P<sub>1</sub> est ensuite le substrat de la PIP5K3 pour former le PtdIns(4,5)P<sub>2</sub> au niveau de l'extrémité du poil absorbant. La synthèse de ces dérivés est nécessaire à la croissance polarisée du poil absorbant. Cependant, le rôle exact de ces phosphoinositides dans la formation des vésicules, leur transport et leur fusion à la membrane plasmique n'est actuellement pas connu. Des mécanismes similaires régulent la croissance du tube pollinique.

PI4Kβ1 : Phosphatidylinositol-(4)-phosphate kinase β 1 ; PIP5K3 : Phosphatidylinositolphosphate-5 kinase 3.

montré que le PtdIns(4,5)P<sub>2</sub> en étant impliqué dans le trafic membranaire et l'acheminement des protéines PIN à la membrane plasmique, joue un rôle dans la formation des racines latérales (Mei *et al.* 2012). L'InsP<sub>6</sub> pourrait également avoir un rôle dans la signalisation de l'auxine. En effet, lors de la cristallisation du récepteur TIR1 de l'auxine, l'InsP<sub>6</sub> a été retrouvé, tout comme l'auxine, lié à ce récepteur (Tan *et al.* 2007). Ce dérivé agirait en tant que co-facteur, potentialisant l'action de l'auxine sur TIR1. Enfin, nous avons vu précédemment que le MI peut également se conjuguer à l'auxine (§2.1.) et il se pourrait que ce dérivé soit une forme de stockage de la phytohormone (Ludwig-Muller 2011).

Les poils absorbants sont des excroissances formées par des cellules racinaires épidermiques, les trichoblastes, permettant l'augmentation des surfaces d'échanges. Si le cytosquelette a un rôle évident dans la croissance et la morphogenèse du poil absorbant (Pei *et al.* 2012), certains dérivés du MI sont également impliqués dans ces processus. Encore une fois, c'est à travers leur fonction dans le trafic membranaire, et plus particulièrement l'exocytose, que le PtdIns(4)P<sub>1</sub> et le PtdIns(4,5)P<sub>2</sub> permettent une croissance correcte et polarisée du poil absorbant (Kusano *et al.* 2008, Preuss *et al.* 2006, Thole *et al.* 2008). Plus précisément, ils permettraient un transport polarisé de vésicules membranaires vers l'extrémité de la cellule en croissance, et la sécrétion de composés formant la paroi (Figure 8).

Pour se développer, la plantule doit générer de nouvelles cellules au niveau des méristèmes apicaux racinaires et caulinaires qui ont pour rôle de maintenir un pool de cellules souches capables de se diviser et de se différencier pour donner de nouveaux organes et tissus. Chez *Arabidopsis*, la protéine phosphatase POLtergeist (POL) a un rôle essentiel pour maintenir les cellules souches des méristèmes racinaires et caulinaires à l'état indifférencié. L'activité de la protéine POL est activée par sa liaison au PtdIns(4)P<sub>1</sub> (Gagne and Clark 2010). Des études pharmacologiques plus anciennes ont également montré qu'une altération de la biosynthèse du MI provoque une inhibition de la division cellulaire (Biffen and Hanke 1990, Das *et al.* 1987). Le MI et ses dérivés pourraient donc être impliqués dans le contrôle de l'équilibre entre le maintien et la division des cellules souches méristématiques.

Une fois produites, les nouvelles cellules peuvent se différencier et s'agrandir jusqu'à acquérir leur fonction finale. Les GPIs ont un rôle essentiel dans leur expansion. En effet, ils permettent d'ancrer la protéine COBRA à la membrane plasmique, du côté extracellulaire. Via sa fonction dans la synthèse des microfibrilles de cellulose, composant de la paroi, cette protéine joue un rôle crucial dans l'expansion cellulaire polarisée (Roudier *et al.* 2005).



Une des étapes importante dans le cycle de vie de tout organisme est la phase de reproduction. Pour cela, les angiospermes utilisent dans la plupart des cas la reproduction dite « sexuée », durant laquelle le pollen germe sur le pistil d'une fleur et développe un tube pollinique qui achemine les gamètes mâles jusqu'aux ovules, porteurs des gamètes femelles. La croissance du tube pollinique est donc essentielle pour permettre la rencontre des gamètes et la fécondation. A travers les mêmes fonctions nécessaires à la croissance du poil racinaire (voir ci-dessus), le PtdIns(4,5)P<sub>2</sub> et les GPIs sont impliqués dans la croissance polarisée du tube pollinique (Ischebeck *et al.* 2008, Lalanne *et al.* 2004), et ainsi dans la reproduction des plantes à fleurs.

Une fois la fécondation réalisée, s'en suit le développement de l'embryon au sein de la future graine. Plusieurs études montrent que via leurs rôles dans le transport de l'auxine et l'adressage des transporteurs PIN à la membrane, les dérivés du MI jouent un rôle important dans l'embryogenèse (Chen and Xiong 2010, Luo *et al.* 2011). Lors de la maturation de la graine, une accumulation de phytate (InsP<sub>6</sub>) est observée. Ce composé en tant qu'antioxydant, protège les cellules de l'augmentation de ROS survenant à cette étape (Doria *et al.* 2009), et surtout constitue une réserve de phosphate (Loewus and Murthy 2000), qui sera utilisée lors des premiers jours de développement des futures plantules.

*Tout au long de la vie de la plante, les dérivés du MI sont donc impliqués dans la division, l'expansion et la différenciation cellulaire, permettant à ces organismes photosynthétiques de capter l'eau et les sels minéraux, de générer des cellules à partir des méristèmes, de les allonger, de se reproduire et donner une descendance viable.*

### **2.2.3. Face aux stress environnementaux**

Les plantes sont des organismes sessiles, elles ne peuvent fuir lorsque les conditions environnementales sont défavorables. Au cours de l'évolution, les individus présentant les meilleures stratégies pour y faire face ont été sélectionnés. Les divers processus impliqués dans les réponses aux stress abiotiques sont par conséquent nombreux et très finement régulés. Le métabolisme du MI, induit en cas de nombreux stress environnementaux, en fait partie (Ishitani *et al.* 1996).

En cas de sécheresse, l'une des premières réponses des plantes est la fermeture de leurs stomates afin de diminuer l'évapotranspiration. Cette réponse est régulée par une phytohormone,



l'Acide Abscissique (ABA), qui provoque la libération du calcium situé dans les vacuoles des cellules de garde et induisant ainsi la fermeture du stomate. De plus, lors d'un stress sécheresse, l'ABA provoque une accumulation d'InsP<sub>6</sub> en quelques minutes, ce qui déclenche l'ouverture des canaux calciques vacuolaires (Lemitiri-Chlieh *et al.* 2003).

Le PtdIns(5)P<sub>1</sub> interagit avec un facteur de remodelage de la chromatine, ARABIDOPSIS HOMOLOG OF THRITORAX 1 (ATX1), qui contrôle positivement la synthèse du facteur de transcription WRKY70. En cas de stress sécheresse, le phosphoinositide s'accumule, conduisant à une rétention cytoplasmique d'ATX1 et par conséquent à une diminution de l'expression de *WRKY70* (Ndamukong *et al.* 2010). Il a été plus récemment montré que WRKY70, préalablement connu comme étant un régulateur des réponses de défense, agit négativement sur la fermeture des stomates (Li *et al.* 2013). En séquestrant ATX1 dans le cytoplasme, le PtdIns(5)P<sub>1</sub> diminue l'expression de *WRKY70*, et lève ainsi l'inhibition de ce facteur de transcription sur la fermeture stomatique.

Le galactinol et le raffinose sont des composants essentiels permettant aux plantes de faire face à de nombreux stress abiotiques, tels que ceux causés par le froid, l'excès de sel dans le sol et la sécheresse (Nishizawa *et al.* 2008, Taji *et al.* 2002). Des plantes transgéniques surexprimant le gène codant la GALACTINOL SYNTHASE 2 (*GolS2*) transpirent moins (sans doute parce que leurs stomates sont globalement plus fermés) et elles deviennent par conséquent plus résistantes à la sécheresse (Taji *et al.* 2002). De ce fait, en cas de manque d'eau, les effets coordonnés de l'InsP<sub>6</sub>, du PtdIns(5)P<sub>1</sub>, du galactinol et sans doute du raffinose, provoquent la fermeture stomatique, permettant aux plantes de résister plus longtemps à la sécheresse.

D'autres études montrent que la synthèse de ces dérivés du MI est induite en cas de forte chaleur, et que lors d'une alternance de gel et dégel, le raffinose joue un rôle de cryoprotectant en s'insérant entre les lipides des membranes des thylakoïdes, il maintient leur intégrité et stabilise le photosystème II (Knaupp *et al.* 2011).

Le galactinol et le raffinose sont également impliqués dans la résistance à de nombreux stress, en contrôlant le taux de molécules s'accumulant lors de ces stress à l'origine de dommages cellulaires : les ROS (Keunen *et al.* 2013). En effet, des plantes surexprimant le gène *GolS2* accumulent plus de galactinol et de raffinose et sont plus tolérantes au froid, au stress salin, ainsi qu'au paraquat, molécule induisant un stress oxydant (Nishizawa *et al.* 2008). De plus, comme vu précédemment (§2.2.1), le galactinol et le raffinose sont capables de détoxifier le radical hydroxyle.



Enfin, des plantes surexprimant le gène codant l'INOSITOL POLYPHOSPHATE KINASE 2 $\beta$  (IPK2 $\beta$ ) présentent une augmentation de l'expression de gènes impliqués dans les réponses aux stress, et par conséquent, ces plantes sont plus résistantes à de nombreux stress abiotiques (Yang *et al.* 2008). Ceci suggère que les inositols polyphosphates seraient impliqués dans le contrôle de l'expression des gènes, et que, tout comme le raffinose et le galactinol, ils joueraient un rôle dans la résistance à de multiples stress.

*Grâce à leurs fonctions de signalisation cellulaire ou de détoxification, les dérivés du MI sont impliqués dans la résistance à de nombreux stress abiotiques. Cependant, les conditions environnementales des plantes ne se limitent à des aspects physico-chimiques mais incluent également des facteurs biotiques.*

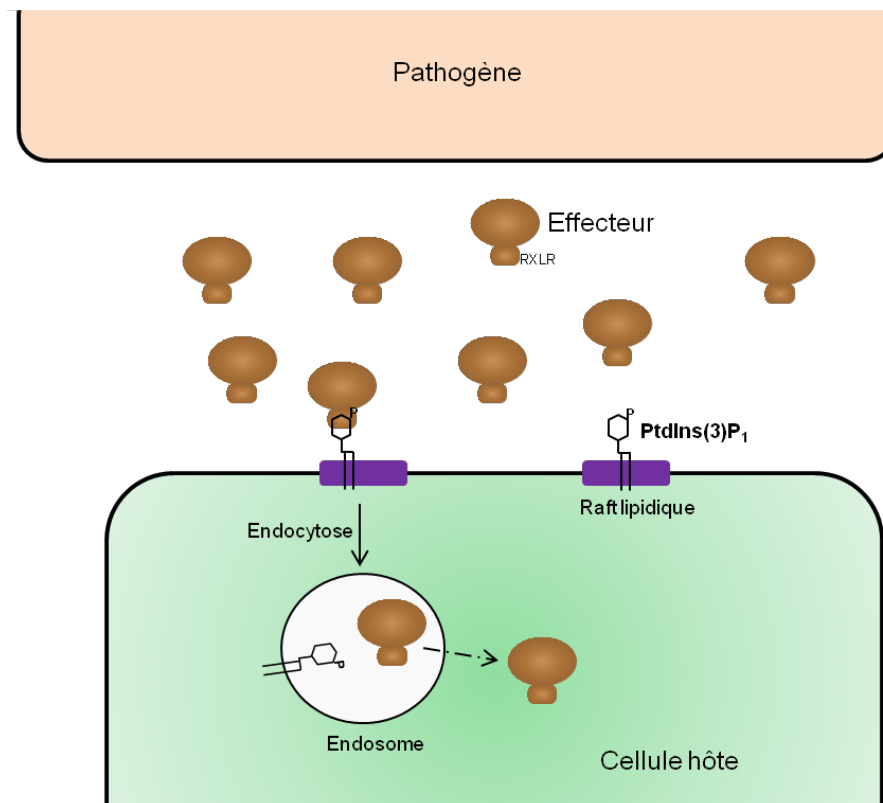
#### **2.2.4. Face aux agents pathogènes**

Certaines molécules ou voies de signalisation impliquées dans les résistances aux stress abiotiques sont également mises en jeu lors d'attaques de pathogènes. C'est le cas de l'acide salicylique (SA), un régulateur majeur des défenses des plantes (Miura and Tada 2014).

L'InsP<sub>6</sub> pourrait être un autre exemple. Ce composé impliqué dans la résistance à la sécheresse, est également nécessaire pour permettre aux plantes de résister au virus de la mosaïque du tabac (Murphy *et al.* 2008). L'InsP<sub>5</sub>, un autre polyphosphate, est également impliqué dans les défenses des plantes face aux pathogènes. Ce composé est un co-facteur de la protéine COI1 (CORONATINE INSENSITIVE 1), récepteur de l'acide jasmonique (JA), hormone agissant dans les réponses de défenses, notamment face aux herbivores (Sheard *et al.* 2010). De plus, il s'avère qu'une augmentation constitutive de la teneur en InsP<sub>5</sub> induit la signalisation du JA et rend les plantes plus résistantes aux herbivores (Mosblech *et al.* 2011). L'InsP<sub>5</sub> potentialiserait l'action du JA sur COI1, déclenchant ainsi les voies de signalisation qui permettent aux plantes de se protéger des pathogènes herbivores.

L'InsP<sub>3</sub> est également un inositol polyphosphate impliqué dans l'immunité des plantes. En effet, ce composé s'accumule en cas d'attaque herbivore (Mosblech *et al.* 2008) et une diminution artificielle de sa concentration dans la plante conduit à des réponses de défenses basales couplées à une résistance systémique altérée (Hung *et al.* 2014). Cependant, comme l'InsP<sub>3</sub> peut être rapidement phosphorylé, et que chez les plantes l'InsP<sub>6</sub> est un messager cellulaire très important, il est toujours difficile de conclure si les effets observés sont réellement imputables à l'InsP<sub>3</sub> ou à ses dérivés avec des degrés de phosphorylation plus importants.





**Figure 9. Modèle expliquant l'entrée d'effecteurs fongiques dans les cellules végétales et animales (d'après Kale *et al.* 2010).**

Les effecteurs sécrétés par le pathogène se lient au PtdIns(3)P<sub>1</sub>, probablement localisé dans des rafts lipidiques (surface membranaire très structurée), grâce à leur domaine RXLR (pour arginine, acide aminé X, leucine, arginine), ce qui conduit à l'endocytose de l'effeteur. Les mécanismes conduisant à la sortie de l'effeteur de l'endosome sont inconnus.

La surexpression de la GolS permet à des plantes de mieux résister à des stress abiotiques mais également à des organismes phytopathogènes tels que *Botrytis cinerea* ou *Erwinia carotovora* (Kim *et al.* 2008b). L'accumulation de galactinol dans les plantes surexprimant la GolS induit l'expression de gènes impliqués dans les défenses des plantes. Cette induction expliquerait la meilleure résistance aux pathogènes, et démontrerait que le galactinol, et/ou le raffinose, pourraient également agir en tant que molécule signal.

Les phosphoinositides sont des lipides appartenant à la membrane plasmique. Ces dérivés sont donc en contact avec l'intérieur de la cellule mais également avec le milieu extracellulaire. Le PtdIns(3)P<sub>1</sub>, relativement abondant du côté externe de la membrane plasmique, est reconnu par des effecteurs protéiques sécrétés par des pathogènes tels que des oomycètes ou des champignons (Kale *et al.* 2010). Ces effecteurs se lient au PtdIns(3)P<sub>1</sub>, probablement localisé dans des rafts lipidiques (surface membranaire très structurée), grâce à leur domaine RXLR (pour arginine, acide aminé X, leucine, arginine), ce qui conduit à l'endocytose de l'effecteur (Figure 9). De manière intéressante, ce mécanisme d'entrée d'effecteurs pathogènes dans la cellule se retrouve à la fois dans le règne animal et végétal (Kale *et al.* 2010).

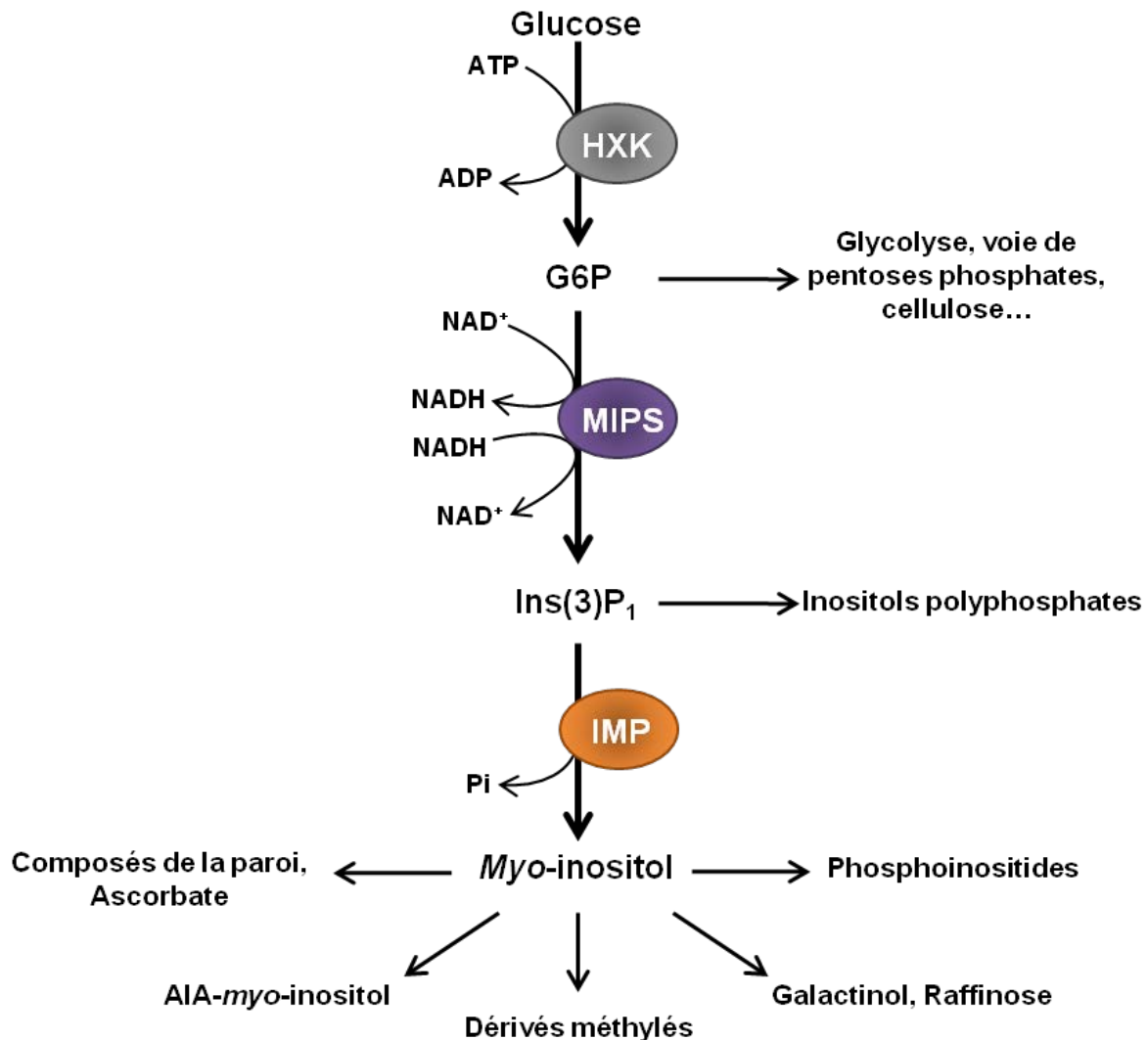
*Le maintien de l'homéostasie du MI apparaît donc fondamental pour contrôler et réguler divers processus cellulaires et de coordonner le développement et les réponses aux stress.*

*Tous ces composés sont issus d'une seule molécule : le myo-inositol. La production du MI et sa régulation sont donc cruciales dans la vie d'une plante, et l'enzyme initiant cette voie de biosynthèse est tout aussi importante. Il s'agit de la Myo-Inositol-3-Phosphate Synthase (MIPS) décrite dans la troisième partie.*

### **3. MIPS, une enzyme clé de la biosynthèse du MI**

Dans une cellule, le MI libre peut être produit par deux voies différentes :

- La déphosphorylation, déméthylation ou hydrolyse de certains dérivés du MI. En effet, les réactions conduisant aux phosphoinositides et inositols polyphosphates, ainsi qu'aux dérivés méthylés et l'AIA-*myo*-inositol peuvent se faire dans les deux sens (Figure 3).
- La prise en charge du Glucose-6-Phosphate (G6P) par la *Myo*-Inositol-3-Phosphate Synthase (MIPS) et sa conversion en Ins(3)P<sub>1</sub>, qui est ensuite déphosphorylé par une *myo*-Inositol MonoPhosphatase (IMP), produisant ainsi du MI libre (Figure 10).



**Figure 10. Schéma de la voie de biosynthèse *de novo* du myo-inositol.**

Une fois le glucose-6-phosphate (G6P) produit par l'HeXoKinase (HXK), la biosynthèse *de novo* du MI est initiée par la Myo-Inositol-3-Phosphate Synthase (MIPS) qui catalyse la conversion du G6P en *myo*-inositol-3-phosphate (Ins(3)P<sub>1</sub>). La production du *myo*-inositol libre est finalement effectuée par la *myo*-Inositol MonoPhosphatase (IMP) qui déphosphoryle l'Ins(3)P<sub>1</sub>.

ADP : Adénosine Diphosphate ; ATP : Adenosine TriPhosphate ; NAD<sup>+</sup> : Nicotiamide Adénine Dinucléotide ; NADH : Nicotiamide Adénine Dinucléotide Hydrogène ; Pi : Phosphate inorganique.

La première voie n'est finalement qu'un recyclage des composés cellulaires, alors que la seconde représente une réelle voie de biosynthèse *de novo* du MI. Cette production du MI libre, initiée par MIPS, est la seule voie de synthèse connue à ce jour chez tous les organismes vivants (Majumder *et al.* 2003), et fera l'objet du prochain paragraphe (§3.1). Les fonctions de l'enzyme seront également abordées chez les plantes (§3.2), et plus particulièrement chez *Arabidopsis* (§4 et 5).

### 3.1. Biosynthèse *de novo* du MI

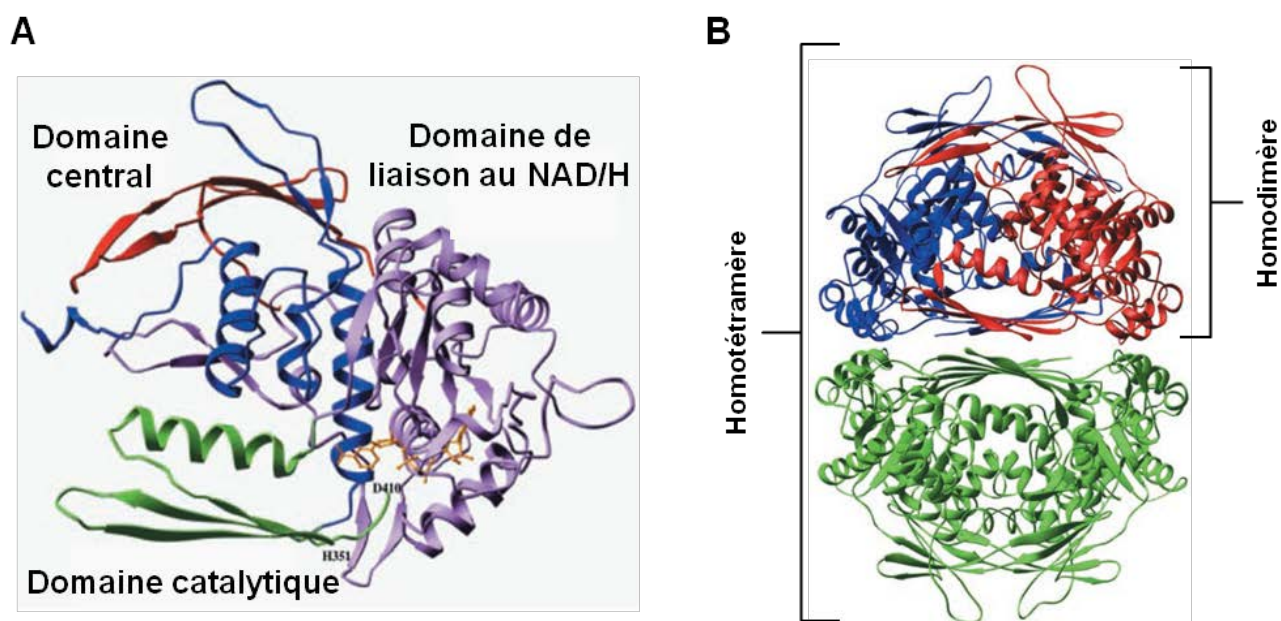
#### 3.1.1. Conversion du G6P en Ins(3)P<sub>1</sub> par MIPS

Le glucose est phosphorylé par l'HexoKinase (HXK), produisant ainsi du G6P. Ce composé peut avoir ensuite plusieurs destins dans la cellule dont l'entrée dans la glycolyse et la voie des pentoses phosphates, ou encore la formation de la cellulose et bien sûr du MI. L'enzyme MIPS catalyse la conversion du G6P en Ins(3)P<sub>1</sub> et initie donc, de manière irréversible, la biosynthèse du MI et de ses dérivés (Figure 10). A ce jour, MIPS est la seule enzyme connue catalysant cette réaction (Loewus and Murthy 2000).

Lors de la conversion du G6P en Ins(3)P<sub>1</sub>, MIPS réalise trois actions principales : une oxydation du G6P, une cyclisation, et une réduction (Loewus and Loewus 1983). Afin d'effectuer les étapes d'oxydoréduction, l'utilisation de co-facteurs, le Nicotiamide Adénine Dinucléotide (NAD<sup>+</sup>), puis de sa forme réduite le Nicotiamide Adénine Dinucléotide Hydrogène (NADH), est nécessaire (Figure 10).

La cristallisation de la protéine MIPS1 de levure (*Saccharomyces cerevisiae*) a montré que l'enzyme correspond à un homotétramère (Stein and Geiger 2002). Chaque monomère peut être divisé en trois domaines dont les fonctions sont différentes (Figure 11) : un domaine central assurant l'interaction et la stabilisation entre les monomères, un domaine catalytique se retrouvant au centre du tétramère, et un domaine de liaison au NAD<sup>+</sup>/NADH. Chez le riz, bien que des formes chloroplastiques de MIPS soient effectivement des homotétramères, il semblerait que des formes cytosoliques de l'enzyme correspondent à des homotrimères (RayChaudhuri *et al.* 1997).

Comme le nom de l'enzyme l'indique, l'Ins(3)P<sub>1</sub> produit par MIPS est uniquement le stéréoisomère de type *myo* (Figure 3), donc la seule voie de biosynthèse *de novo* ne produit que du



**Figure 11. Structure tridimensionnelle de la protéine MIPS issue de *S.cerevisiae* (d'après Stein et Geiger 2002).**

La représentation en ruban d'un monomère de MIPS (A) montre que l'enzyme présente 3 domaines : un domaine central, un domaine de liaison au NAD/H et un domaine catalytique. Le domaine central est impliqué dans la formation d'homodimères (B) qui se regroupent ensuite en homotétramères. Les 4 domaines catalytiques de chaque monomère de MIPS se retrouvent au centre de l'homotétramère (B).

NAD/H : Nicotiamide Adénine Dinucléotide/Hydrogène.

*myo*-inositol. Les autres stéréoisomères sont produits à partir des dérivés du MI (Loewus and Murthy 2000)<sup>1</sup>.

### 3.1.2. Conversion de l'Ins(3)P<sub>1</sub> en MI libre par l'IMP

L'Ins(3)P<sub>1</sub> produit par MIPS peut ensuite être directement utilisé pour produire des inositols polyphosphates (Figure 3), mais c'est sa déphosphorylation par une IMP qui permet de synthétiser le MI libre. Il faut remarquer que l'Ins(3)P<sub>1</sub> peut également être obtenu lors de la déphosphorylation des inositols polyphosphates (Figure 3), ce qui implique que l'IMP a un rôle dans la production du MI via la voie de biosynthèse *de novo*, mais également via le recyclage des dérivés du MI.

De manière intéressante, l'IMP est une enzyme bifonctionnelle chez les plantes, elle est à la fois impliquée dans biosynthèse du MI et dans celle de l'ascorbate, via la voie utilisant le GDP-mannose et non le MI (Fu *et al.* 2008, Torabinejad *et al.* 2009). La mutation du gène *VITAMIN C 4 (VTC4)* codant une IMP chez *A. thaliana*, conduit à la fois à une légère diminution de la teneur en MI et en ascorbate (Torabinejad *et al.* 2009). Deux autres gènes *IMP-LIKE 1* et *IMP-LIKE 2 (IMPL1 et IMPL2)* coderaient d'autres isoformes d'IMP chez cette plante modèle (Sato *et al.* 2011), ce qui expliquerait que la mutation de *VTC4* ne provoque qu'une faible baisse de teneur en MI.

*La voie de biosynthèse de novo du MI se réalise en seulement deux réactions catalysées par MIPS et l'IMP qui jouent ainsi un rôle crucial dans la formation des dérivés du MI.*

*Lors de mon doctorat, mes travaux se sont focalisés sur l'enzyme MIPS, qui catalyse l'étape limitante de la biosynthèse du MI (Loewus and Murthy 2000). Tandis que la partie §3.2 abordera les différentes fonctions de MIPS chez les plantes d'intérêt agronomique, les parties §4 & §5 détailleront l'implication de cette enzyme, et plus particulièrement de l'enzyme MIPS1, dans la synthèse de MI chez Arabidopsis thaliana, plante modèle utilisée au laboratoire.*

<sup>1</sup> Il faut noter que l'International Union of Biochemistry accepte deux écritures pour l'inositol phosphate produit par MIPS : L-*myo*-inositol-1-phosphate ou D-*myo*-inositol-3-phosphate. Les deux écritures se retrouvent dans la littérature, conduisant parfois une certaine confusion, mais toutes deux sont généralement abrégées en Ins(3)P<sub>1</sub> (Tableau 1.). Par conséquent, l'enzyme catalysant sa biosynthèse peut être nommée L-*myo*-inositol-1-phosphate synthase ou D-*myo*-inositol-3-phosphate synthase. Augmentant la confusion, différentes abréviations sont utilisées par les chercheurs, telles que INO, IPS ou encore MIPS, pour désigner cette enzyme qui est référencée sous le numéro EC 5.5.1.4. Uniquement l'abréviation MIPS sera employée dans ce document.



### 3.2. MIPS : une enzyme d'intérêt agronomique

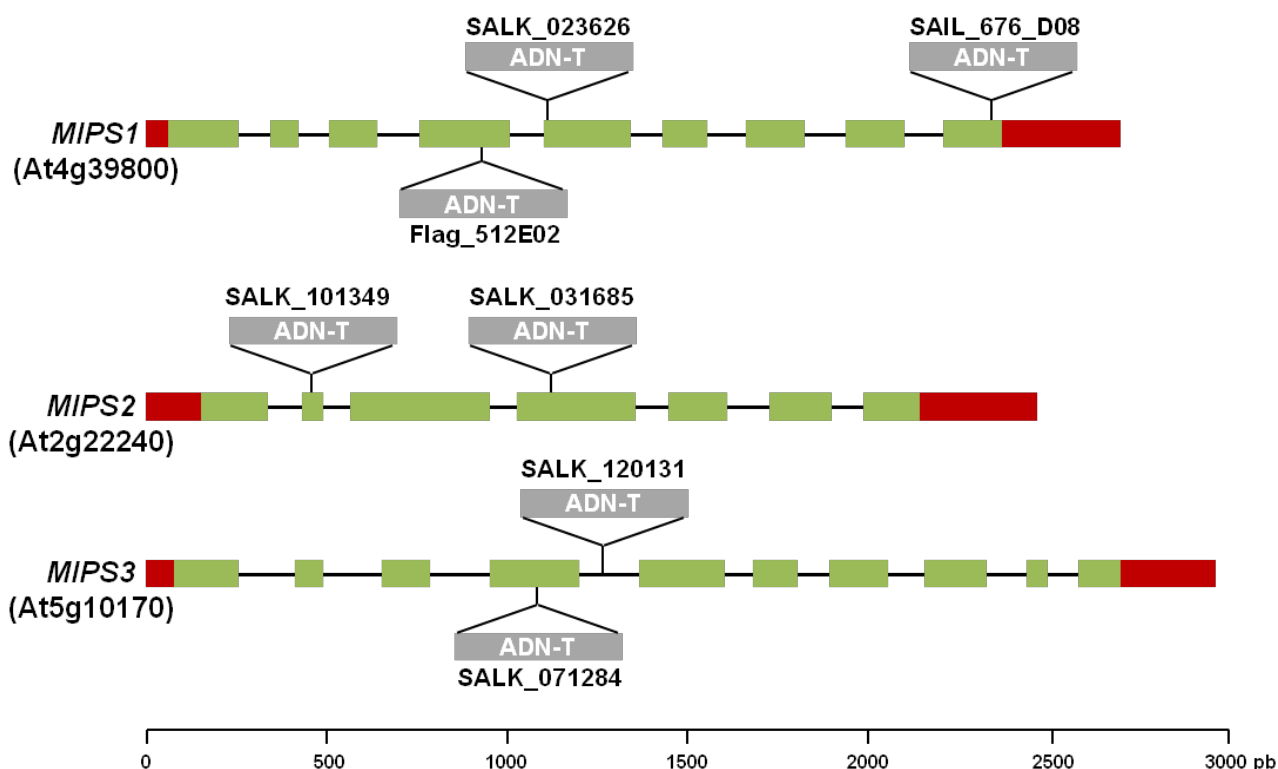
Le MI et ses dérivés semblent être des constituants ubiquitaires chez les eucaryotes, et ils se retrouvent également chez les bactéries et les archées (Michell 2008). Le premier gène codant une enzyme MIPS a été identifié chez la levure *S. cerevisiae* (Donahue and Henry 1981) : il s'agit du gène *INO1* (pour INOsitol synthase 1). Depuis, grâce aux avancées technologiques et aux recherches de nombreux laboratoires, des gènes codant des enzymes MIPS ont été identifiés dans plus de 60 organismes appartenant aux trois règnes du vivant (Majumder *et al.* 2003).

Dans le règne végétal, le premier gène codant une enzyme MIPS à avoir été identifié est le gène *TURION 1* (*TURI*), chez *Spirodella polyrrhizale* (Smart and Fleming 1993). Par la suite, l'intérêt pour cette enzyme chez les plantes cultivées s'est accru. En effet, le phytate, un dérivé du MI, qui s'accumule fortement dans la graine comme forme de stockage du phosphate, est néfaste pour la santé humaine et l'environnement (Raboy 2001). Sa consommation crée un déficit en Zinc chez l'Homme et est à l'origine de pollutions de l'eau lorsqu'il est consommé et rejeté par des animaux non ruminants (tels que les volailles, les porcs et les poissons). Or, l'ABA, connu pour réguler la synthèse de composés s'accumulant dans la graine, induit l'expression du gène *RICE INO 1* (*RINO1*), codant une enzyme MIPS, dans des cultures cellulaires issues de graines de riz (*Oriza sativa*) (Yoshida *et al.* 2002), ce qui pourrait avoir des conséquences indirectes sur la teneur phytate.

Afin de réduire la teneur en phytate dans la graine, des travaux visant à diminuer l'activité de MIPS ont été réalisés. Chez *Arabidopsis*, l'altération de chacun des gènes *MIPS* n'a pas d'effet sur la teneur en phytate (Kim and Tai 2011), alors que dans des plantes d'intérêt agronomique telles que le maïs ou le soja (*Glycine max*), une diminution de l'activité MIPS conduit à une réduction de la teneur en phytate dans les graines

Cependant, altérer la fonction de cette enzyme peut avoir des effets défavorables sur le développement de la plante. En effet, chez le maïs, le mutant *low phytic acid 1* (*lpa1*), muté dans un gène codant une enzyme MIPS (Larson and Raboy 1999), présente une faible teneur en phytate mais également une masse sèche des graines diminuée (Raboy *et al.* 2000), tandis qu'une réduction de l'expression du gène *MIPS* chez le soja, par ARN interférence, conduit à un avortement de l'embryon dans la graine (Nunes *et al.* 2006). Par une approche similaire, la diminution de l'expression de *MIPS* chez la pomme de terre (*Solanum tuberosum*) provoque un phénotype pléiotrope caractérisé par une réduction de la dominance apicale, une altération de la morphologie des feuilles, une diminution dans le rendement du tubercule et une sénescence précoce (Keller *et al.* 1998).





**Figure 12. Structure des gènes *MIPS1*, *MIPS2* et *MIPS3* chez Arabidopsis.**

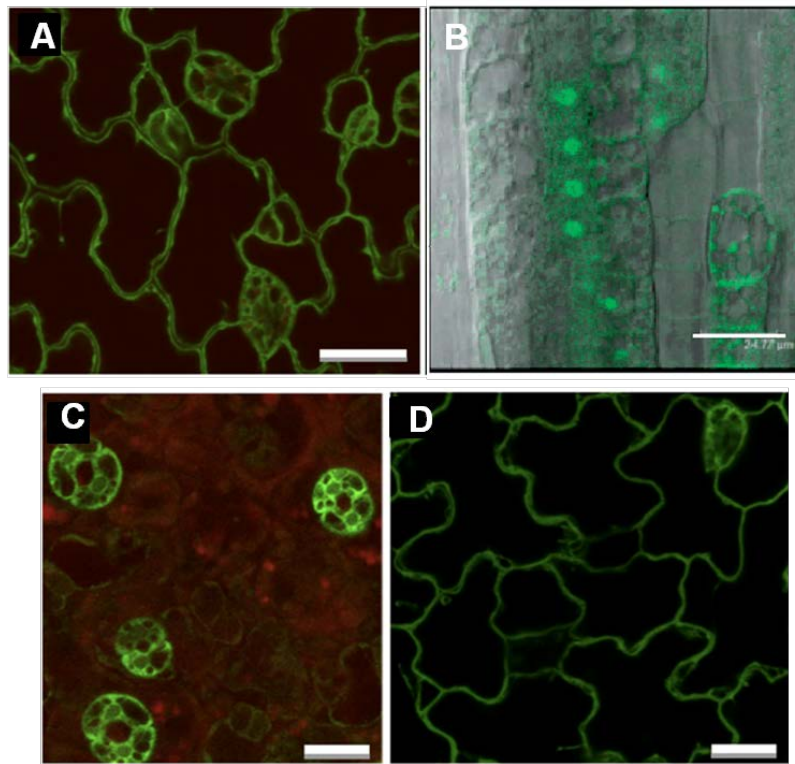
Les rectangles pleins représentent des exons, tandis que les barres entre les exons représentent les introns. Les rectangles rouges représentent les régions 5' et 3' non traduites, les rectangles verts représentent les régions traduites. Il est également indiqué, la position des ADN de transferts (ADN-T) dans les allèles mutants des gènes *MIPS* décrits dans la littérature. Les lignées SALK et SAIL sont dans le fond génétique de l'écotype Columbia-0 (Col-0), alors que la lignée FLAG est dans l'écotype Wassilewskija (Ws).

Les dérivés du MI sont impliqués dans la résistance à de nombreux stress (§2.2.3). En toute logique, l'expression du gène *MIPS* est induite en réponse à la sécheresse, au froid ou à un stress salin chez *Medicago falcata* (Tan *et al.* 2013). L'expression du gène *MIPS2* de pois-chiche (*Cicer arietinum*) est également induite par l'ABA (Kaur *et al.* 2008). De plus, l'expression ectopique du gène *MfMIPS1* (issu de *M. falcata*), chez le tabac (*Nicotiana tabacum*) génère des plantes plus résistantes aux stress précédemment cités (Tan *et al.* 2013). Par une approche similaire, l'expression ectopique des gènes *CaMIPS2*, issu du pois-chiche, et *SalNO1*, issu de l'halophyte *Spartina alterniflora*, chez *Arabidopsis*, crée des plantes transgéniques possédant une résistance augmentée au stress salin et à la sécheresse (Joshi *et al.* 2013, Kaur *et al.* 2013). De même, l'expression de *PcINO1*, issu d'une variété sauvage et halophyte de riz (*Porteresia coartata*), chez le tabac permet de créer des plantes plus résistantes au sel (Majee *et al.* 2004).

*L'étude du gène MIPS chez des espèces d'intérêt agronomique s'avère intéressante afin de créer des variétés plus comestibles, plus résistantes aux stress abiotiques mais également plus respectueuses de l'environnement. Cependant, comme l'enzyme MIPS est à l'origine de nombreux dérivés, le fait de moduler son activité peut provoquer d'autres effets non désirables pouvant affecter le rendement.*

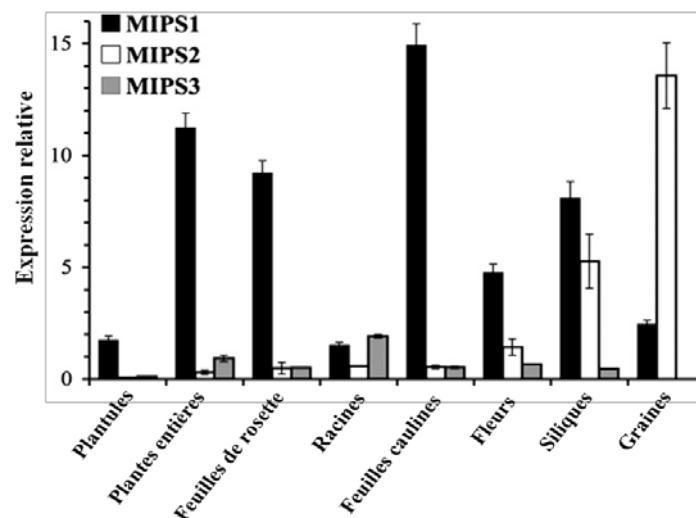
#### **4. Les gènes *MIPS* : une famille multigénique chez *Arabidopsis thaliana***

*Arabidopsis thaliana*, l'organisme modèle utilisé lors de ma thèse ne présente que très peu d'intérêt agronomique, mais reste à l'heure actuelle l'outil le plus puissant pour les approches de génétique moléculaire chez les plantes. Le premier gène codant une enzyme MIPS à avoir été identifié chez cette plante est *MIPS1* (At4g39800). Il fut initialement isolé grâce à sa capacité à compléter un mutant de levure déficient pour le gène *INO1* (Johnson and Sussex 1995). Par la suite, le séquençage et l'annotation du génome d'*Arabidopsis* a mis en évidence deux autres gènes codant des enzymes MIPS : *MIPS2* (At2g22240) et *MIPS3* (At5g10170), également capables de compléter le mutant *ino1* chez *S.cerevisiae* (Luo *et al.* 2011). La structure génique de ces trois paralogues montre des différences au niveau du nombre d'exons et de leur longueur, mais les tailles des séquences transcrites sont très proches (Figure 12). De plus, les séquences protéiques font presque la même longueur, à plus ou moins un acide aminé, et partagent environ 90% d'identité (Luo *et al.* 2011). En 2010, l'activité des trois enzymes a été mesurée *in vitro* (Donahue *et al.* 2010), confirmant ainsi leurs fonctions catalytiques dans la



**Figure 13. Localisation subcellulaire des protéines MIPS chez *A.thaliana* (d'après Donahue *et al.* 2010, Latrasse *et al.* 2013).**

Les protéines de fusion MIPS1-GFP (A,B), MIPS2-GFP (C) et MIPS3-GFP (D) présentent des localisations subcellulaires cytoplasmiques au sein des cellules épidermiques de cotylédons (Donahue *et al.* 2010). Bien que l'expression des gènes soit sous contrôle du promoteur du virus de la mosaïque du chou-fleur (promoteur 35S) la protéine MIPS2-GFP n'est visible que dans les cellules de garde (C). La protéine de fusion MIPS1-GFP est également présente dans les noyaux des cellules (B) (Latrasse *et al.* 2013).



**Figure 14. Expression des gènes *MIPS* dans différents organes d'*A.thaliana* (d'après Donahue *et al.* 2010)**

Pour les plantules et les plantes entières, tous les organes ont été utilisés pour extraire les ARN. Les plantes entières étaient cultivées en terre et âgées de 18 jours. Les différents organes ont été prélevés sur des plantes sauvages d'écotype Col-0 âgées de 25 jours cultivées en JL.

biosynthèse de l'In(3)P<sub>1</sub>. Chez *Arabidopsis*, la diversification des gènes *MIPS* semble donc n'avoir engendré que peu de modifications en termes de séquences protéiques ou d'activités catalytiques, mais serait plutôt à l'origine de différences au niveau de la localisation subcellulaire des enzymes (§4.1) et de l'expression spatiotemporelle des gènes (§4.2).

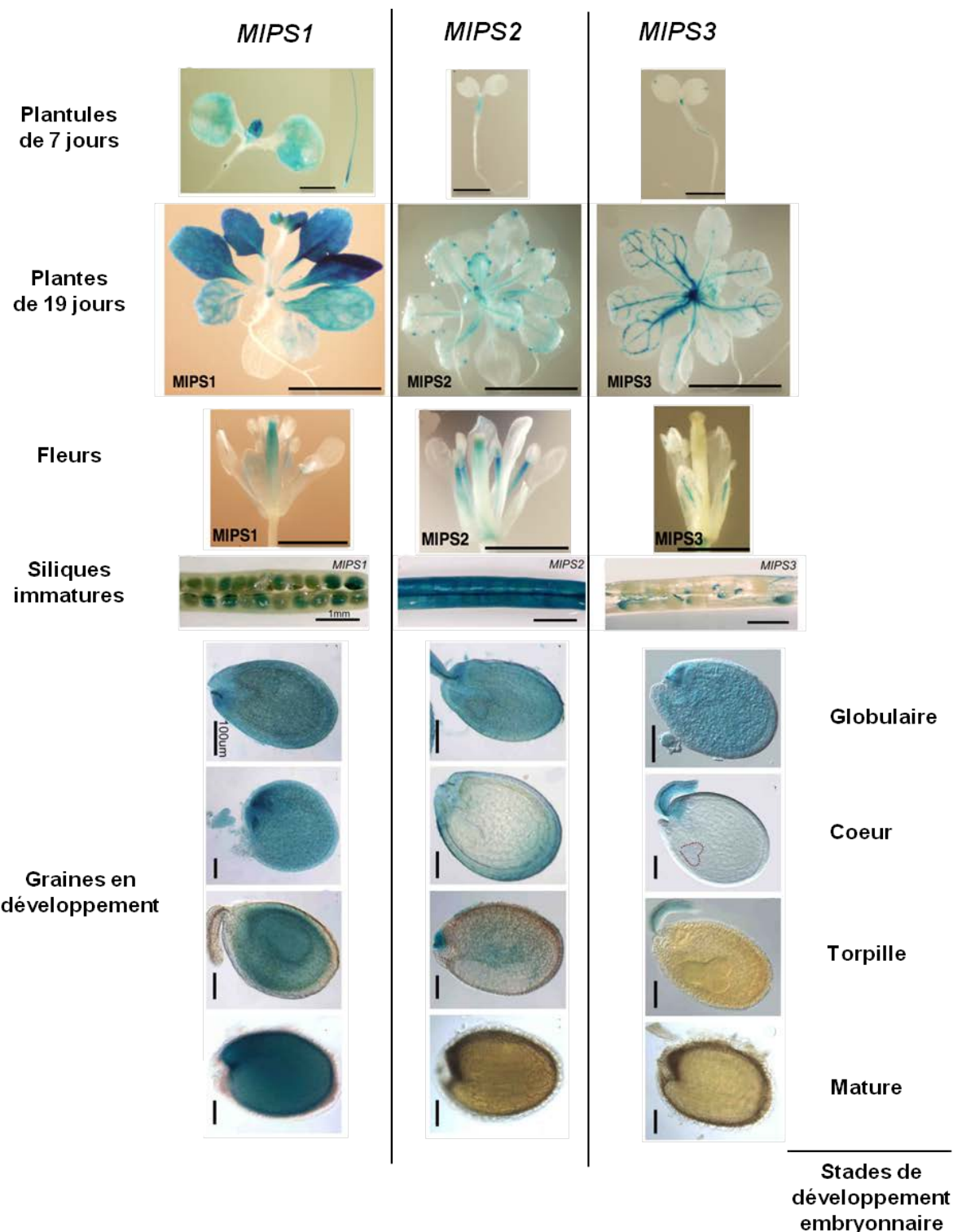
#### **4.1. Localisation subcellulaire des différentes isoformes de MIPS chez *Arabidopsis***

Des analyses récentes dans des protoplastes et *in planta*, utilisant des protéines fusionnées à la « Green Fluorescent Protein » (GFP), ont démontré que MIPS1 peut se localiser dans le cytosol, dans le réticulum endoplasmique, ainsi que dans le noyau (Figure 13A et B) (Chen and Xiong 2010, Donahue *et al.* 2010, Latrasse *et al.* 2013, Meng *et al.* 2009). Cette localisation nucléaire était surprenante puisque des études plus anciennes avaient démontré que les protéines MIPS se localisent uniquement dans le cytosol (Majumder *et al.* 2003) voire dans les chloroplastes chez l'algue *Euglena gracilis* (Adhikari *et al.* 1987) et les plantes *Oriza sativa* (riz), *Vigna radiata* (haricot mungo) et *Phaseolus vulgaris* (haricot commun) (Johnson and Wang 1996, RayChaudhuri *et al.* 1997). Quant aux protéines MIPS2 et MIPS3, elles se localisent uniquement dans le cytosol (Figure 13C et D) (Donahue *et al.* 2010).

#### **4.2. Expression des gènes *MIPS* au cours du développement**

Plusieurs études se sont employées à évaluer le niveau d'expression des gènes *MIPS* dans les différents organes d'*Arabidopsis* en mesurant l'accumulation des transcrits de chacun des gènes (Chen and Xiong 2010, Donahue *et al.* 2010, Luo *et al.* 2011). Si les résultats ne concordent pas tout à fait entre eux, probablement à causes de différences dans les conditions de culture et les stades de développement utilisés, ces travaux ont pu mettre en lumière deux points importants (Figure 14) :

- L'expression de l'un des 3 gènes peut être détectée dans presque tous les organes (les transcrits de *MIPS2* et *MIPS3* ne sont pas visibles dans certains organes).
- *MIPS1* est de loin le gène le plus exprimé dans la plupart des tissus, et à l'échelle de la plante entière (âgée de 18 jours). Cependant, le niveau d'expression de *MIPS2* est équivalent à celui de *MIPS1* dans les siliques, et le dépasse dans les graines, tandis que l'expression de *MIPS3* est égale à celle de *MIPS1* uniquement dans la racine.

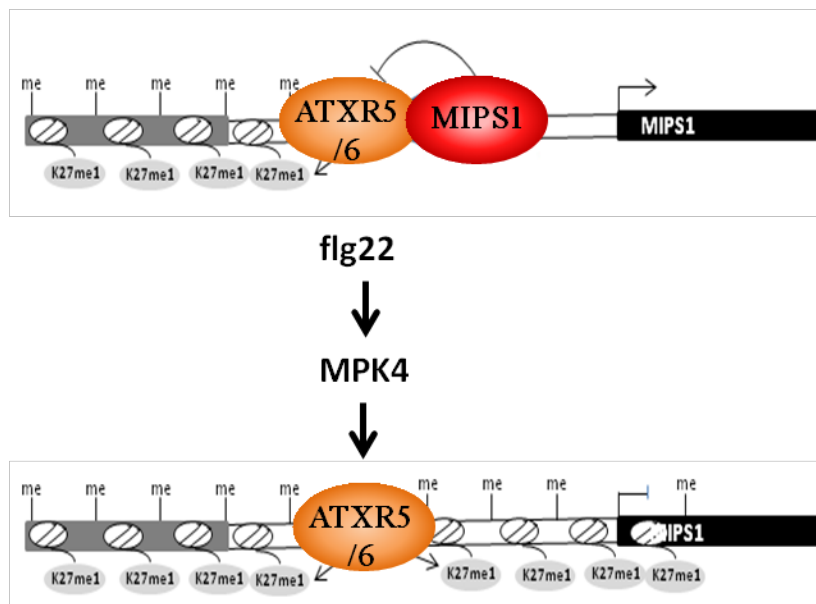


**Figure 15. Localisation de l'expression des gènes *MIPS* par la technique de coloration GUS dans différents organes d'*A.thaliana* (d'après Donahue *et al.* 2010, Luo *et al.* 2011).**

Les promoteurs des gènes *MIPS1*, *MIPS2* et *MIPS3* ont été fusionnés au gène rapporteur *uidA*, puis les constructions ont été introduites chez des plantes sauvages Col-0. Les images des plantules, des plantes, des fleurs et des siliques immatures sont issues de Donahue *et al.* 2010. Les images des graines en développement proviennent de Luo *et al.* 2011.

La fusion transcriptionnelle de la région promotrice (2 kb en amont du site d'initiation de la transcription) de chaque gène avec le gène rapporteur codant pour la  $\beta$ -glucuronidase (GUS) a permis de visualiser à un niveau tissulaire l'activation des promoteurs des trois gènes *MIPS* au cours du développement (Figure 15) (Chen and Xiong 2010, Donahue *et al.* 2010, Luo *et al.* 2011) :

- **Dans les plantules**, *MIPS1* s'exprime dans les cotylédons, les jeunes primordia et dans les racines, où l'activité GUS se retrouve essentiellement dans le système vasculaire et la pointe racinaire. L'expression de *MIPS2* est restreinte à l'hypocotyle et à l'extrémité des primordia foliaires, alors que celle de *MIPS3* se localise dans les systèmes vasculaires des parties aériennes et des racines ainsi que dans les trichomes.
- **Dans des plantes âgées de 19 jours** et cultivées *in vitro*, l'expression de *MIPS1* est visible dans toutes les cellules des jeunes feuilles mais se limite au système vasculaire des feuilles plus âgées. *MIPS2* s'exprime uniquement au niveau des hydathodes des feuilles et l'expression de *MIPS3* se cantonne à nouveau au système vasculaire.
- **Dans des feuilles matures** de plantes plus âgées et cultivées en terre, *MIPS2* et *MIPS3* gardent le même profil d'expression alors que l'expression de *MIPS1* est essentiellement détectée dans la partie distale du limbe foliaire.
- **Au niveau des pièces florales**, *MIPS1* et *MIPS2* sont exprimés dans le pistil et les filets des étamines alors que dans les sépales, l'activité du promoteur de *MIPS3* est encore restreinte aux vaisseaux.
- **Au sein des siliques**, alors que *MIPS2* s'exprime dans tous les tissus au début du développement des graines, l'expression de *MIPS1* est restreinte dans les futures graines et celle de *MIPS3* aux funicules.
- **Lors du développement de la graine**, *MIPS1* s'exprime dans tous les tissus de celle-ci jusqu'au stade cœur de l'embryon. A partir du stade torpille, l'accumulation de GUS reste forte même dans des graines matures, sauf dans les téguments. Au stade globulaire, l'expression de *MIPS2* et *MIPS3* est similaire à celle de *MIPS1*, mais après ce stade, l'activité du promoteur de ces gènes n'est plus détectée dans l'embryon et diminue fortement. L'expression de *MIPS2* est ensuite située dans les téguments et dans l'endosperme et celle de *MIPS3* se restreint au funicule, puis aucune coloration GUS n'est visible dans les graines matures pour ces deux gènes.



**Figure 16. La protéine MIPS1 régule sa propre expression (d'après Latrasse *et al.* 2013).**

La protéine MIPS1 se fixe sur son propre promoteur où elle empêche la propagation de l'hétérochromatine due à l'action des Histones Méthyl-Transférases (HMT) ATXR5 et 6. Pour cela, MIPS1 est capable d'interagir avec ATXR6 et d'inhiber son activité HMT. En cas de perception de la flagelline 22 (flg22) la voie de signalisation passant par MPK4 empêche MIPS1 de se fixer sur son propre promoteur, ce qui permet la propagation de l'hétérochromatine liée probablement à la présence d'un élément transposable dans la partie distale du promoteur du gène *MIPS1*.

Il faut toutefois noter que la coloration GUS n'est qu'une indication de la localisation tissulaire de l'expression des gènes *MIPS*. En effet, elle présente certaines limites, car en ne prenant qu'une séquence de 2 kb en amont du site d'initiation de la transcription, l'expression des gènes d'intérêts n'est plus sous le contrôle d'éventuelles séquences inhibitrices ou activatrices situées dans des régions intragéniques ou plus en amont. Par exemple, la coloration GUS détecte une forte expression de *MIPS1* à tous les stades de développement de la graine alors que celle de *MIPS2* diminue rapidement après les premières étapes de l'embryogenèse (Luo *et al.* 2011). Pourtant la quantification des transcrits montre que *MIPS2* est plus fortement exprimé dans les graines (Donahue *et al.* 2010). De plus, une immunodétection de la protéine MIPS1 permet de la localiser uniquement dans l'endosperme (Mitsubishi *et al.* 2008) alors que l'activation du promoteur est visible dans toute la graine (Luo *et al.* 2011). Ainsi, ces divergences entre les résultats obtenus par différentes approches suggèrent qu'il existe une régulation transcriptionnelle complexe de *MIPS1* par des séquences situées hors du promoteur utilisé par Donahue *et al.* (2010), ou que l'accumulation de la protéine pourrait également être régulée post-transcriptionnellement.

En cohérence avec l'hypothèse d'une régulation complexe de la transcription de *MIPS1*, le laboratoire a récemment mis en évidence que cette enzyme régule sa propre expression (Latrasse *et al.* 2013). En effet, la protéine MIPS1 se lie directement à son propre promoteur pour stimuler son expression en inhibant la propagation de l'hétérochromatine due probablement à la présence d'un élément transposable et à l'action des protéines ATXR5/6 qui codent pour des Histone Méthyl Transférases (HMT), facteurs clés de régulation épigénétique. Cette inhibition de la propagation de l'hétérochromatine (forme condensée de la chromatine et non propice à la transcription) par MIPS1 pourrait s'expliquer par le fait que les trois protéines interagissent ensemble *in vivo* (§3.3.1.), et que MIPS1 inhibe l'activité HMT d'ATXR6 *in vitro* (Latrasse *et al.* 2013). Les auteurs ont également montré qu'en cas de stress biotique mimé par le peptide flagelin22 (fgl22), issu du constituant principal du flagelle bactérien, l'induction d'une cascade de signalisation passant par la Mitogen activated Protein Kinase 4 (MPK4) diminue la fixation de MIPS1 sur son propre promoteur conduisant ainsi à la propagation de l'hétérochromatine (Figure 16).

Enfin, il faut noter que même si l'expression des gènes *MIPS* est induite en cas de stress salin ou par l'ABA chez d'autres espèces, et que la surexpression chez *Arabidopsis* de MIPS provenant de *C. arietinum* ou *P. coartata* confère une plus grande résistance au sel et à la





sécheresse (§3.2), la transcription de *MIPS1* ne semble pas être régulée par l'ABA et le stress salin chez *Arabidopsis* (Chen and Xiong 2010).

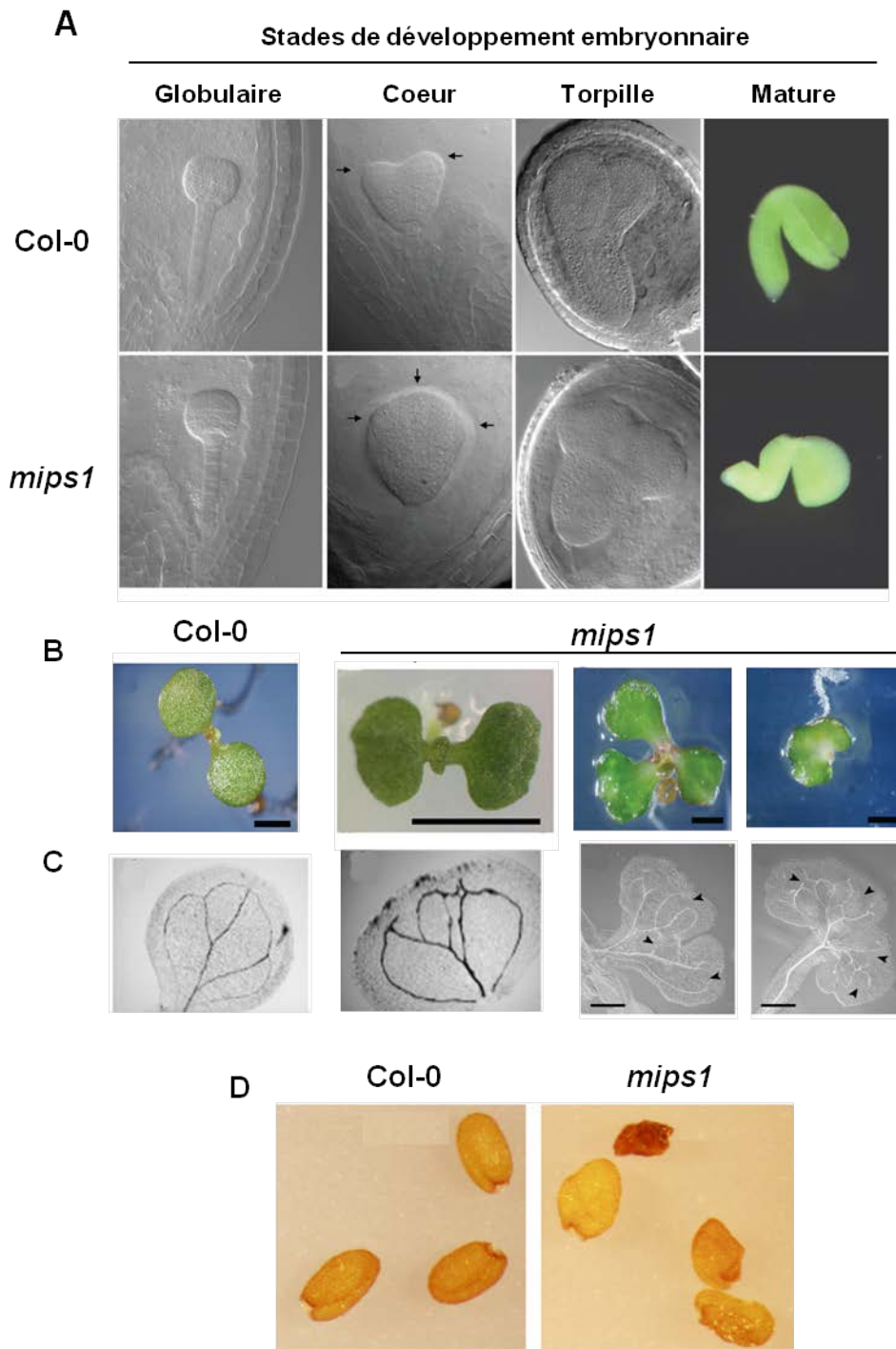
*Ces données d'expression montrent que la transcription des gènes MIPS est régulée de façon spatiotemporelle. Par ailleurs, il semble que le gène MIPS1 présente l'expression la plus forte ou la plus étendue dans différents organes d'Arabidopsis telles que les feuilles, les racines et la graine, suggérant un rôle prépondérant de ce paralogue dans le métabolisme du MI au niveau de ces tissus.*

## 5. Le mutant *mips1* d'*Arabidopsis*

Les mutants *mips* décrits dans cette partie sont des mutants obtenus par insertion d'un ADN de transfert (ADN-T) dans le gène d'intérêt, ils sont stockés et distribués par des banques publiques de mutants (Alonso *et al.* 2003). Pour chaque gène *MIPS*, il existe différents allèles représentés sur la Figure 12. Pour chacun de ces allèles, il a été montré que l'insertion de l'ADN-T ne permet pas la synthèse de transcrits pleine longueur et par conséquent bloque la synthèse de la protéine complète. Les mutants correspondants sont donc appelés des mutants KO (pour *Knock Out*). De ce fait, afin de ne pas créer une confusion, l'allèle ne sera pas spécifié dans la suite de cette partie, et les mutants désactivés seront appelés *mips1*, *mips2* et *mips3*. Concernant le mutant *mips1*, l'allèle utilisé dans la plupart des études ainsi que lors de mon doctorat, est celui qui possède une insertion au début du 5<sup>ème</sup> exon et qui est référencé sous le numéro SALK\_023626. Comme la plupart des autres mutants *mips*, ce mutant *mips1* est dans le fond génétique de l'écotype Columbia-0 (Col-0). Les plantes dite « sauvages » ainsi que les mutants utilisées par les études concernant *Arabidopsis* et lors de ma thèse sont, sauf mention contraire, d'écotype Col-0.

Les simples mutants *mips2* et *mips3* ne présentent pas de diminution significative de la teneur en MI que ce soit dans les feuilles ou dans la plante entière (Donahue *et al.* 2010). Au contraire, la désactivation du gène *MIPS1* conduit à une diminution drastique du MI dans les feuilles du mutant *mips1* et représente environ 15% de ce qui est normalement observé chez le sauvage (Meng *et al.* 2009).

Logiquement aucun phénotype particulier n'est observé pour les mutants *mips2* et *mips3* (Chen and Xiong 2010, Luo *et al.* 2011), alors que *mips1* présente de nombreuses anomalies au cours de son développement (§5.1 et 5.2), et des réponses altérées face à certains stress (§5.3).



**Figure 17. Phénotypes embryonnaires du mutant *mips1* (d'après Chen et Xiong 2011, Donahue *et al.* 2010, Meng *et al.* 2009).**

Les embryons du mutant *mips1* commencent à présenter des anomalies à partir du stade cœur, au stade torpilles les cotylédons sont clairement mal formés et à maturité on peut également constater des anomalies racinaires et de repliement de l'embryon (A). Ces altérations survenues au cours de l'embryogenèse sont visibles sur les cotylédons des plantules (B) qui présentent aussi une anomalie de la mise en place du système vasculaire (C). Les graines comportant des embryons déformés sont plus petites et ridées (D).

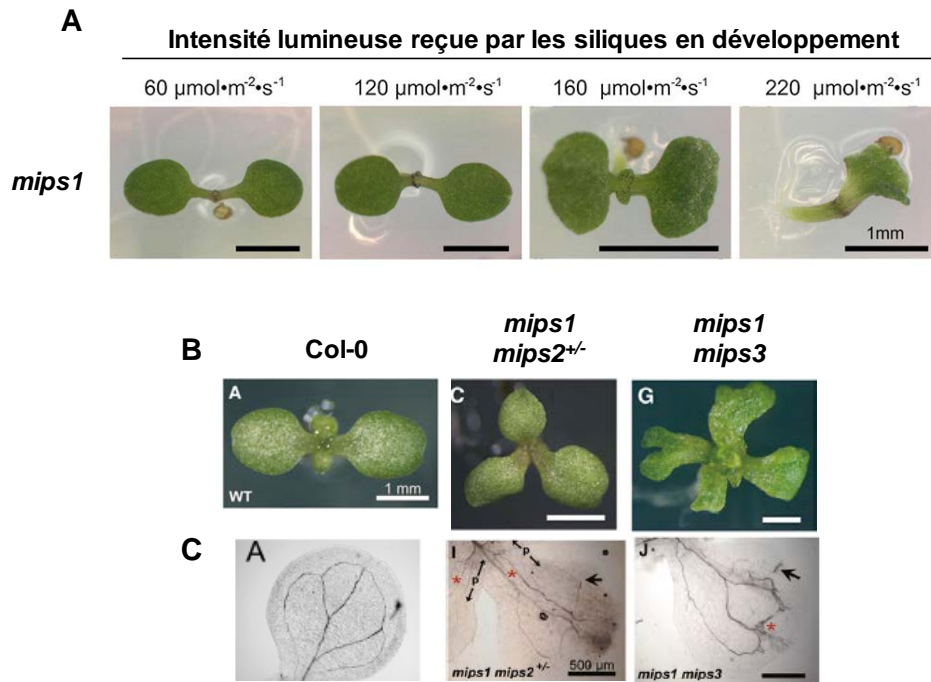
### 5.1. *mips1* présente des défauts du développement embryonnaire

A partir du stade cœur, des défauts de développement de l'embryon peuvent être observés chez le mutant *mips1*. Au stade torpille, des embryons avec un nombre de cotylédons supérieur ou inférieur à 2, ou avec des cotylédons soudés, sont visibles (Figure 17A) (Chen and Xiong 2010). De plus, ils semblent grandir en largeur plutôt qu'en longueur comme chez le sauvage. Les embryons matures du mutant *mips1* présentent clairement des anomalies morphologiques au niveau des cotylédons et de la racine, et ils ne sont pas repliés à l'intérieur de la graine comme des embryons de type sauvage (Figure 17A) et par conséquent, les graines du mutant *mips1* comportant des embryons mal formés, ne sont pas aussi lisses et ovales que des graines de plantes sauvages (Figure 17D) (Chen and Xiong 2010, Donahue *et al.* 2010). Cependant, malgré ces défauts, le rendement en graine des mutants *mips1* est identique au sauvage indiquant que les étapes de gamétogenèse et de fécondation ne sont sans doute pas affectées (Donahue *et al.* 2010).

Par ailleurs, le taux de germination est diminué chez *mips1* comparé au sauvage et il est plus sensible aux effets de l'ABA, du NaCl et du sorbitol (Donahue *et al.* 2010), ce qui pourrait également être une conséquence des malformations embryonnaires.

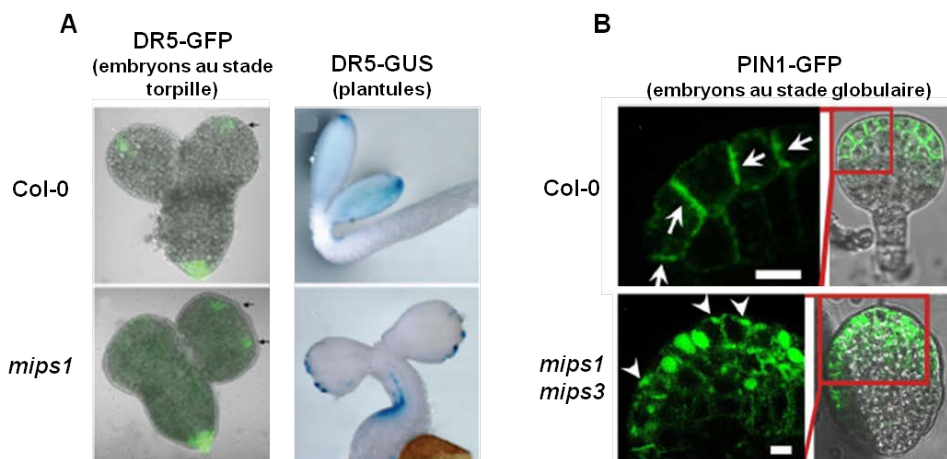
Les défauts survenus lors de l'embryogenèse sont visibles à l'œil nu lorsque les plantules ont commencé leur développement (Figure 17B). Celles-ci présentent un nombre aberrant de cotylédons, et leur forme est irrégulière, contrairement au sauvage qui possède des cotylédons ovales et lisses (Chen and Xiong 2010, Donahue *et al.* 2010, Luo *et al.* 2011, Meng *et al.* 2009). De plus, le système vasculaire de ces organes présente de nombreuses anomalies, telles que qu'une asymétrie globale, des variations du nombre de boucles, et des vaisseaux dont l'extrémité n'est pas branchée (Figure 17C).

Il faut noter que les phénotypes du mutant *mips1* au niveau des cotylédons et des graines présentent différents degrés de sévérité allant des cotylédons et des graines de formes comparables au sauvage, à des plantules ne présentant plus de cotylédons et des graines beaucoup plus petites et ridées (Figure 17). Les travaux de Luo *et al.* (2011) montrent que la sévérité de ces phénotypes est corrélée à la quantité de lumière reçue par les siliques lors de leur développement (Figure 18A). Plus la quantité de lumière reçue par les plantes est forte, plus le phénotype est sévère. Par exemple, à une intensité lumineuse de 60 ou 120  $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$  de photons, le mutant *mips1* ne présente aucun problème de développement embryonnaire, en revanche, à partir de 160  $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$  de photons, des cotylédons anormaux commencent à être observés (Luo *et al.* 2011).



**Figure 18. Phénotypes embryonnaires du mutant *mips1* en fonction de la lumière et des mutants *mips1<sup>-/-</sup> mips2<sup>+/-</sup>* et *mips1 mips3* en condition de faible luminosité (d'après Chen et Xiong 2011, Luo *et al.* 2011).**

La sévérité des anomalies survenant lors du développement embryonnaire chez *mips1* est corrélée à l'intensité lumineuse reçue par les siliques lors de leur développement (A). En condition de faible luminosité (60 à 120  $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ ), le sesquimutant *mips1<sup>-/-</sup> mips2<sup>+/-</sup>* et le double mutant *mips1 mips3* présentent également des anomalies du développement embryonnaire visibles au niveau des cotylédons des plantules issus de ces embryons (B). Les systèmes vasculaires au sein des cotylédons de ces plantules sont également altérés (C).



**Figure 19. Les anomalies embryonnaires observées chez *mips1*, *mips1 mips2<sup>+/-</sup>* et *mips1 mips3* sont dues un défaut dans le transport polaire de l'auxine (d'après Chen et Xiong 2011, Luo *et al.* 2011).**

Les constructions rapportrices DR5-GFP et DR5-GUS, dont l'expression est sensible à la concentration en auxine, montrent des anomalies dans la localisation des maxima de concentration en auxines au niveau des cotylédons d'embryons et de plantules chez *mips1* (A). Le transporteur d'auxine PIN1-GFP ne présente pas une localisation membranaire polarisée au sein des embryons du double mutant *mips1 mips3* (B), ce qui pourrait expliquer les anomalies de transport de l'auxine et les phénotypes embryonnaires observés chez *mips1*, *mips1 mips2<sup>+/-</sup>* et *mips1 mips3*.

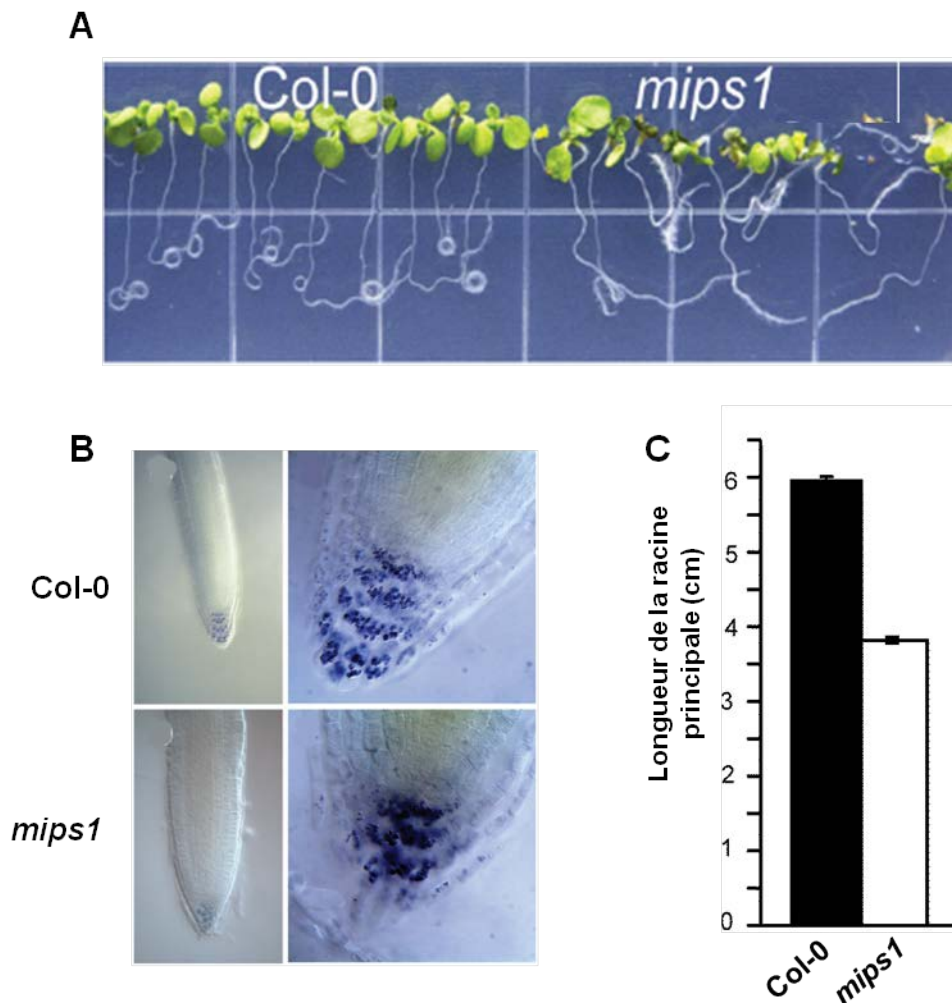
MIPS1 est donc nécessaire pour synthétiser suffisamment de MI lors du développement de l'embryon en condition restrictive de forte luminosité. En conditions permissives, de plus faible luminosité, le MI produit par les enzymes MIPS2 et MIPS3 serait suffisant pour assurer l'embryogenèse. En effet, le double mutant *mips1 mips3* et le sesqui-mutant *mips1<sup>-/-</sup> mips2<sup>+/-</sup>* présentent les mêmes phénotypes embryonnaires en conditions permissives que le simple mutant *mips1* en conditions restrictives (Figure 18B et C), alors que le double mutant *mips1 mips2* présente une létalité embryonnaire (Luo *et al.* 2011).

Ces analyses, ainsi que les données d'expressions (§4.2), suggèrent que l'enzyme MIPS1 synthétise la majeure partie du MI lors du développement de la graine, et que la protéine MIPS2 joue également un rôle dans cette biosynthèse. En revanche, l'activité de MIPS3 ne semble pas être limitante dans la biosynthèse du MI lors de l'embryogenèse.

Au cours de l'embryogenèse, le développement des cotylédons est contrôlé par des gradients de concentration en auxine (Moller and Weijers 2009). Une des approches utilisée pour localiser les zones de forte concentration en auxine dans les tissus, est de visualiser l'expression d'un gène rapporteur sous le contrôle d'un promoteur inductible par l'auxine tel que le promoteur synthétique *DR5*.

Cette approche a permis de montrer qu'un seul maximum d'auxine est observé à l'extrémité de chaque cotylédon d'embryons sauvages, alors que plusieurs maxima sont observés chez les mutant *mips1*, *mips1 mips3* et *mips1 mips2<sup>+/-</sup>* (Figure 19A) (Chen and Xiong 2010, Luo *et al.* 2011).

Un défaut dans le transport polarisé de l'auxine pourrait être à l'origine de ces anomalies embryonnaires. Les gènes *PIN-formed* (*PIN*) codent des transporteurs d'auxine dont la localisation membranaire polarisée, spécifique à une ou deux faces de la cellule, est nécessaire à l'efflux et au transport directionnel de cette phytohormone. Au cours du développement embryonnaire, la protéine PIN1 présente une localisation subcellulaire anormale (Figure 19B), sur toutes les faces de la cellule, dans les lignées *mips1 mips3* et *mips1 mips2<sup>+/-</sup>* (Luo *et al.* 2011), ce qui affecterait l'acheminement polarisé de l'auxine à l'extrémité des cotylédons. Par ailleurs, le trafic membranaire polarisé dépendant d'endosomes recyclés (structures membranaires intracellulaires formées après endocytose) est impliqué dans l'adressage spécifique de la protéine PIN1 à une face bien déterminée de la cellule (Geldner *et al.* 2003). L'analyse du double mutant *mips1 mips3*, en conditions de faible luminosité, montre que l'endocytose est diminuée dans les cellules de ce double mutant, affectant ainsi le trafic membranaire et l'adressage de la protéine PIN1 à la membrane (Luo *et al.* 2011). Il est fort probable qu'un mécanisme similaire soit



**Figure 20. Phénotypes racinaires du mutant *mips1* (d'après Chen et Xiong 2011, Meng *et al.* 2010).**

Le mutant *mips1* présente des défauts de réponses gravitropiques au niveau racinaire (A). La photo est prise après quelques jours en croissance verticale puis 2 jours à l'horizontale (Chen et Xiong 2011). La pointe racinaire du mutant *mips1* présente une désorganisation des cellules de la columelle, avec les plans de divisions et les formes des cellules altérées (B). De plus, la racine principale du mutant *mips1* est plus courte, pour des plantules âgées de 19 jours (C).

responsable des défauts embryonnaires observés chez le mutant *mips1* en conditions de plus forte luminosité.

Les phosphoinositides sont des dérivés du MI impliqués dans le trafic membranaire polarisé chez les plantes (§2.2.1). Le fait que la teneur en PtdIns soit diminuée chez le mutant *mips1* (Chen and Xiong 2010, Donahue *et al.* 2010), et le fait que la surexpression des gènes *PIS1* et *PIS2*, codant des Phosphatidylinositol Synthase, supprime les anomalies embryonnaires du double mutant *mips1 mips3* (Luo *et al.* 2011), suggèrent qu'une diminution en PtdIns est responsable de cette altération du trafic membranaire polarisé.

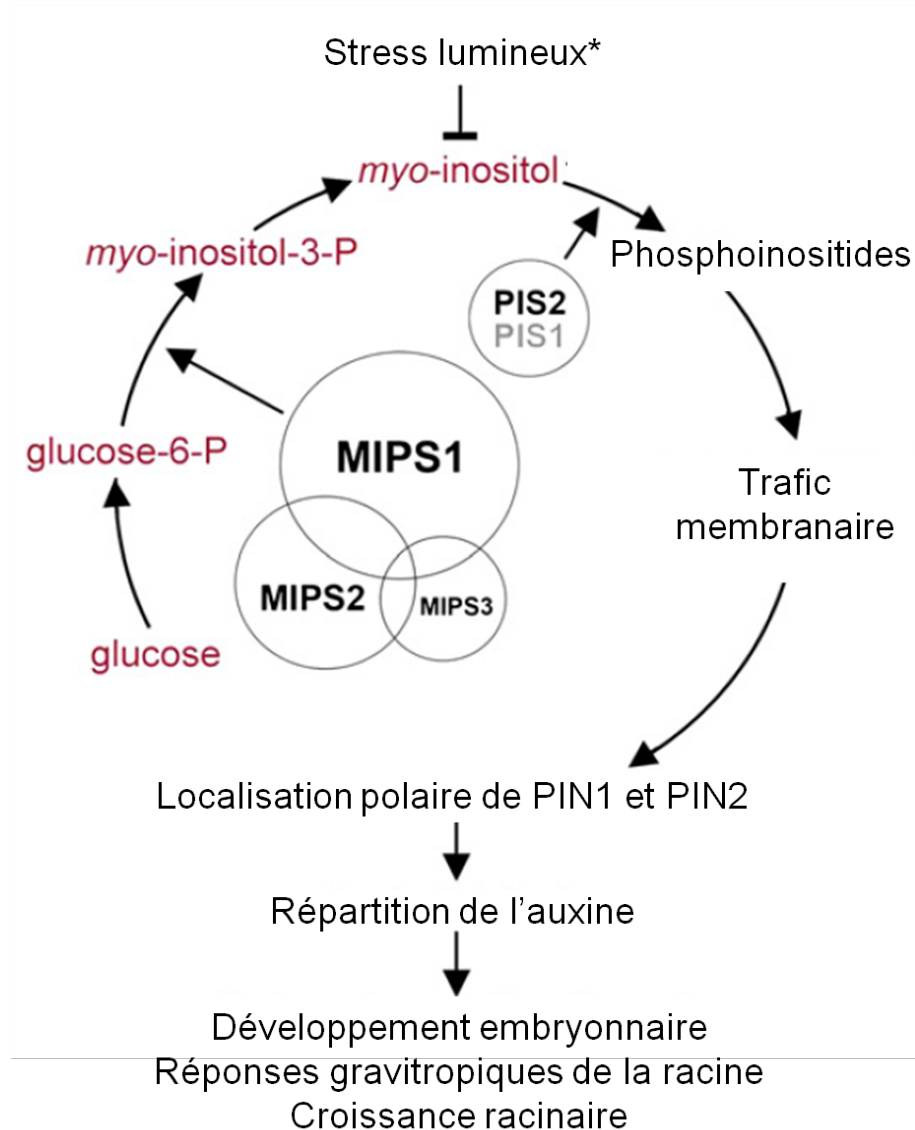
## 5.2. *mips1* présente des défauts du développement racinaire

Une fois les graines germées, le développement du mutant *mips1* continue à être altéré, notamment au niveau racinaire : la racine principale est plus courte chez *mips1* comparée à celle du type sauvage, et la réponse gravitropique est également affectée (Figure 20C) (Chen and Xiong 2010). En effet, lors de tests de réponses gravitropiques, les racines ne se réorientent pas correctement (Figure 20A) (Chen and Xiong 2010).

Au niveau de la coiffe racinaire, les cellules de la columelle sont le centre de perception de la gravité. Les amyloplastes qu'elles contiennent « tombent » sous la force de la gravité, orientant ainsi la croissance de la racine. Dans le mutant *mips1*, les cellules de la columelle contiennent des amyloplast, mais ils sont plus petits et en moins grand nombre (Chen and Xiong 2010, Meng *et al.* 2009). De plus, au lieu de couches cellulaires bien alignées au sein de la columelle des pointes racinaires sauvages, aucune couche cellulaire n'est clairement reconnaissable chez *mips1* (Figure 20B). La forme des cellules, leur alignement et les plans de divisions sont altérés (Chen and Xiong 2010, Meng *et al.* 2009).

Ces anomalies pourraient expliquer le défaut de réponse gravitropique mais il semble que ce soit plutôt le transport de l'auxine qui en soit responsable. Lorsque les amyloplast « tombent », ils induisent des cascades de signalisations et le transporteur PIN2 redistribue l'auxine vers le côté de la racine se trouvant vers le bas. La phytohormone inhibe l'élongation des cellules dans lesquelles elle s'accumule tandis que les cellules de l'autre face continuent de s'allonger ce qui redirige la pointe racinaire vers le bas. Comme lors de l'embryogenèse (§5.1), il semble que dans le mutant *mips1* une diminution de la quantité en PtdIns ne permette pas d'assurer un trafic membranaire correct et une localisation membranaire polarisée de PIN2 (Chen and Xiong 2010). Il en résulterait un défaut dans le transport de l'auxine qui expliquerait le problème de réponse gravitropique.





**Figure 21. Modèle expliquant le rôle des gènes *MIPS* dans le développement embryonnaire, dans les réponses gravitropiques et la croissance de la racine chez *Arabidopsis* (modifié d'après Luo *et al.* 2011).**

Le MI, dont l'enzyme MIPS catalyse l'étape limitante de biosynthèse, est impliqué dans la synthèse des phosphoinositides. Une quantité suffisante de ces dérivés membranaires est importante pour assurer un trafic membranaire correct, et donc une localisation polarisée des transporteurs de l'auxine, PIN-FORMED 1 et 2 (PIN1 et PIN2), qui régulent le pattern de développement de l'embryon, les réponses gravitropiques de la racine et la croissance racinaire. La taille des cercles entourant le nom des enzymes MIPS représente leur importance relative dans la biosynthèse du MI au sein de la graine. \* Une quantité plus importante de MI est nécessaire pour assurer un développement embryonnaire correct en cas de stress lumineux, cependant il n'a pas été montré que la lumière influence les phénotypes racinaires du mutant *mips1*.

PIS1 et 2 : Phosphatidylinositol Synthase 1 et 2.

Il ne faut pas exclure que les défauts racinaires et de développement embryonnaire pourraient également être dus non pas à un défaut de transport d'auxine mais à un problème dans sa perception. En effet, l'InsP<sub>6</sub> (le phytate), est un co-facteur du récepteur de l'auxine TIR1 (§2.2.2). Cependant, le fait que l'ajout de phytate dans le milieu ne supprime pas les phénotypes de *mips1* (Chen and Xiong 2010), ne va pas dans le sens de cette hypothèse<sup>1</sup>.

*A travers son rôle prépondérant dans la biosynthèse du MI, l'enzyme MIPS1 est nécessaire pour assurer un développement normal de l'embryon et du système racinaire (Figure 21). Il reste à savoir maintenant si la désactivation du gène MIPS1 a un effet sur les réponses aux stress biotiques et abiotiques (§5.3).*

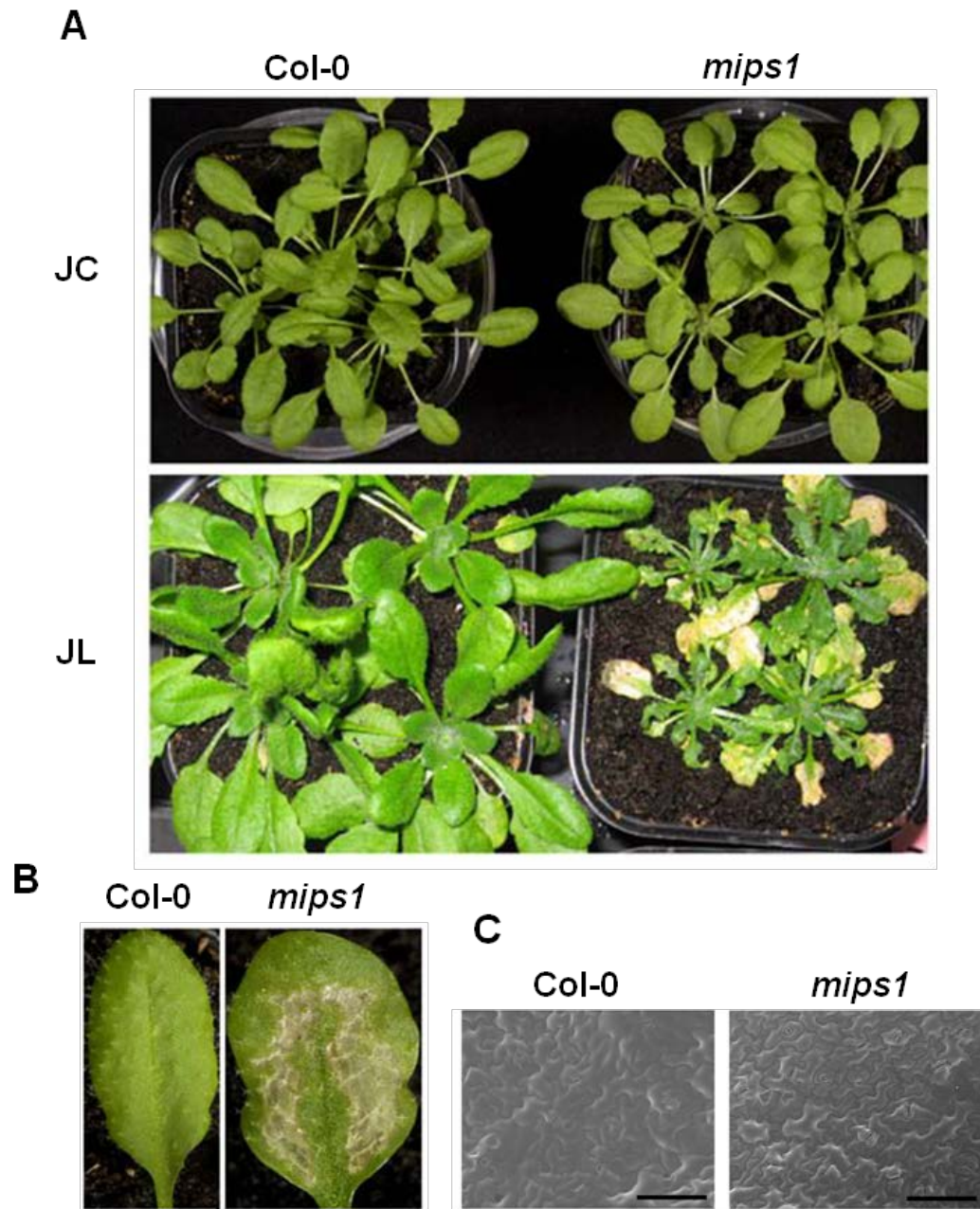
### 5.3. Le mutant *mips1* face aux stress

Les réponses de défense du mutant *mips1* ont été testées, et que ce soit face au virus de la mosaïque du tabac, à des souches virulentes ou avirulentes de la bactérie *Pseudomonas syringae* ou au champignon nécrotrophe *Botrytis cinerea*, *mips1* présente la même résistance ou sensibilité qu'une plante sauvage (Murphy *et al.* 2008). Le mutant *mips1* est toutefois plus résistant à l'oomycète biotrophe *Haloperonospora parasitica* Noco2 (Meng *et al.* 2009), suggérant un rôle de la protéine MIPS1 dans la réponse aux pathogènes biotrophes. Au contraire, face à ces différents pathogènes, le mutant *mips2* présente dans tous les cas une plus grande sensibilité ou une plus faible résistance que le sauvage (Murphy *et al.* 2008), suggérant un rôle de MIPS2 dans ces réponses.

Malgré le fait que les dérivés du MI soient impliqués dans la résistance à de nombreux stress abiotiques (§2.2.3), et que la surexpression ectopique chez *Arabidopsis* d'enzymes MIPS, issues de *Cicer arietinum* et *Porteresia coartata*, confère une résistance accrue à la sécheresse et au stress salin (§3.2), aucune étude n'a testé la résistance du mutant *mips1* à des stress environnementaux chez *A. thaliana*.

La désactivation du gène *MIPS1* altère cependant l'acclimatation des plantes aux conditions lumineuses. En effet, alors qu'en condition de Jours Courts (JC ; 8h de lumière/16h d'obscurité) le développement des feuilles de rosette de *mips1* est similaire à celui du sauvage (Figure 22A), si ces mêmes plantes sont cultivées quelques semaines en JC puis transférées en condition de Jours

<sup>1</sup> Il faut noter que les auteurs n'apportent pas la preuve que le phytate est capable de pénétrer dans les tissus. En effet, dans le cas où ce composé rentrerait dans les cellules, celui-ci pourrait être converti en MI.



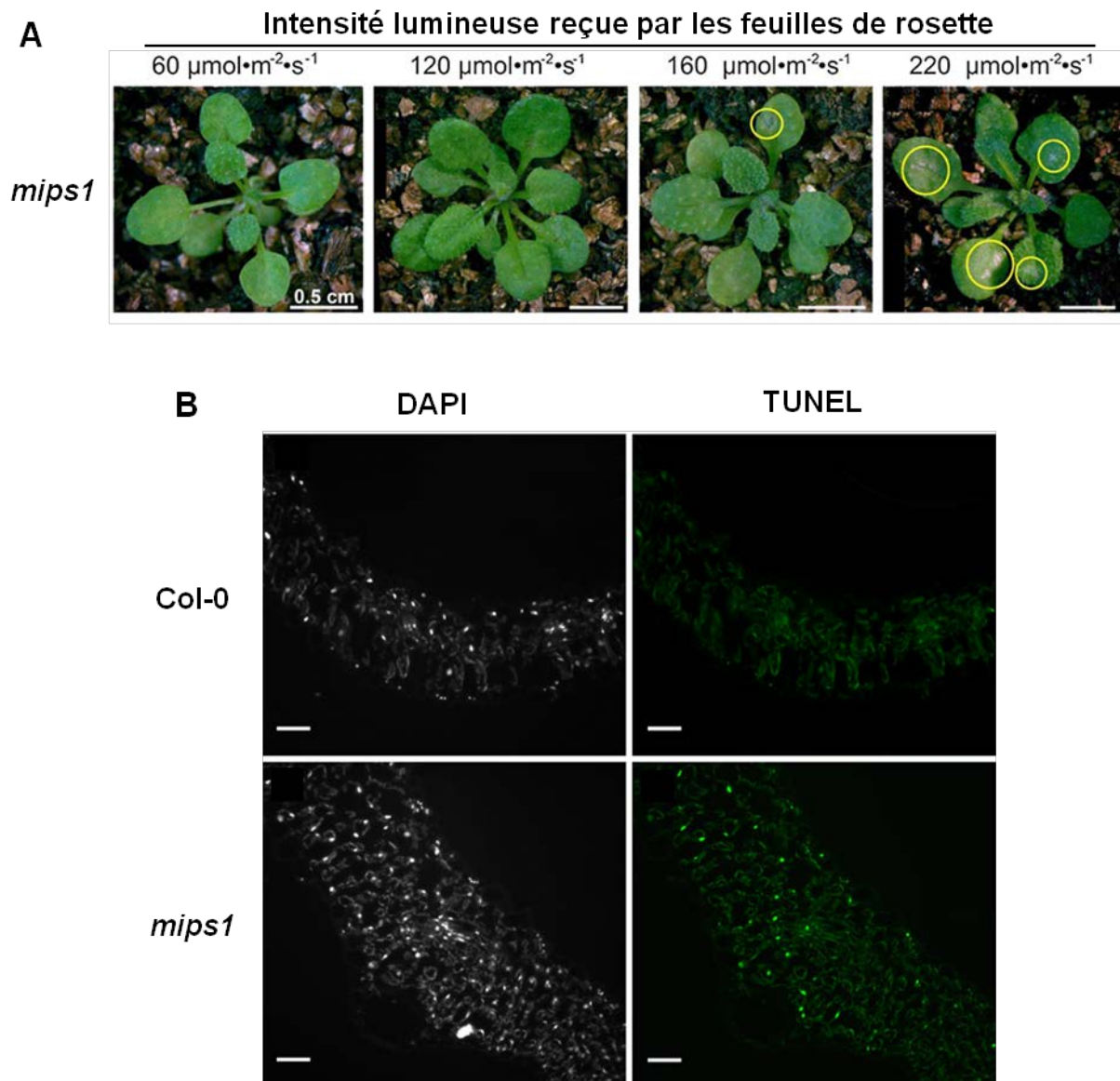
**Figure 22. Phénotype du mutant *mips1* (d'après Meng *et al.* 2009).**

En jour-court (JC), le développement des rosettes du mutant *mips1* est similaire au sauvage *Col-0* (A), cependant si des plantes cultivées en JC sont transférées en jour-long (JL), des lésions apparaissent spontanément sur les limbes foliaires du mutant *mips1* (A et B). En JL, même les feuilles sans lésions sont gaufrées chez *mips1* (A), et les cellules épidermiques des feuilles sont plus petites (C), ce qui conduit à une surface de rosette inférieure comparée à celle de *Col-0*.

Longs (JL ; 16h de lumière/8h d'obscurité), des lésions apparaissent de manière spontanée sur les limbes foliaires des feuilles de rosette après 4 jours (Figure 22A et B) (Donahue *et al.* 2010, Meng *et al.* 2009). Des analyses plus poussées ont pu démontrer que ce n'est pas la photopériode elle-même qui régule l'apparition de ces lésions mais la quantité de lumière reçue par les plantes au cours d'une journée (Luo *et al.* 2011, Meng *et al.* 2009). Par exemple, en JC mais avec une luminosité de  $225 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ , des lésions, dont la sévérité est proportionnelle à l'intensité lumineuse, apparaissent, (Figure 23A) (Luo *et al.* 2011, Meng *et al.* 2009). Dans les conditions restrictives, le mutant *mips1* présente également des feuilles gaufrées, des cellules épidermiques plus petites conduisant à des feuilles et des rosettes dont la surface est inférieure à celles des sauvages (Figure 22C) (Meng *et al.* 2009).

Etant donné que les lésions présentes sur les feuilles du mutant *mips1* apparaissent de manière spontanée, elles pourraient être dues à de la nécrose ou de la MCP. Dans ce cas, une fragmentation de l'ADN des cellules est généralement observée. Afin de discriminer entre les deux formes de mort, le laboratoire a utilisé la technique TUNEL (*Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP Nick End Labelling*) qui permet de mettre en évidence une fragmentation de l'ADN en marquant avec des fluorochromes les extrémités 3'OH des brins d'ADN fragmentés. L'analyse de coupes de feuilles du mutant *mips1* en condition restrictive, a permis de mettre en évidence que les lésions spontanées sont dues à de la MCP (Figure 23B) (Meng *et al.* 2009).

*Le mutant mips1 se caractérise par une diminution drastique de la biosynthèse de novo du MI et présente de nombreux phénotypes dont la formation de lésions spontanées sur les feuilles, constitue l'une des altérations majeures. Le laboratoire a décidé de focaliser ses travaux sur ce phénotype de MCP spontanée. La seconde partie de l'introduction a pour but de donner un aperçu du rôle de la MCP dans la vie des plantes (§II).*



**Figure 23. L'apparition des lésions les feuilles du mutant *mips1* est dépendante de l'intensité lumineuse et est due au processus de mort cellulaire programmée (d'après Luo *et al.* 2011, Meng *et al.* 2009).**

Les lésions qui apparaissent sur les feuilles de rosette du mutant *mips1* ne sont pas dépendantes de la photopériode mais de la quantité de lumière reçue au cours d'une journée. La sévérité des lésions est proportionnelle à l'intensité lumineuse (A). Les noyaux de cellules épidermiques de coupes transversales de feuilles de Col-0 et *mips1* sont marqués au DAPI (B). La technique de TUNEL permet de mettre en évidence un marquage uniquement dans les feuilles de *mips1* (B), démontrant que les lésions spontanées chez ce mutant sont dues à de la MCP.

## II. La Mort Cellulaire Programmée chez les plantes

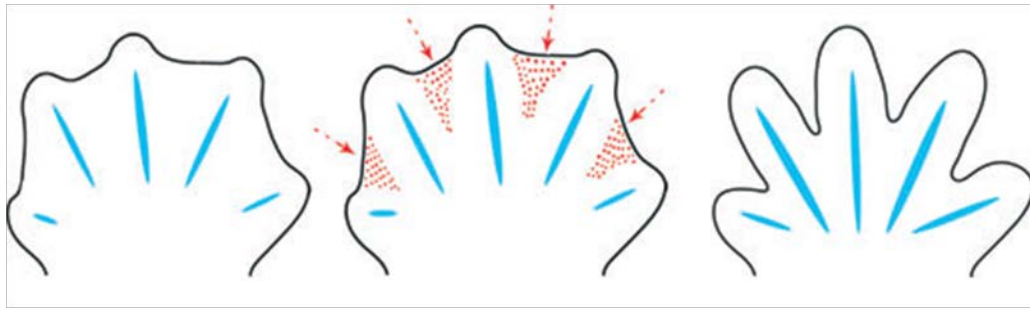
Le terme de Mort Cellulaire Programmée (MCP) apparaît pour la première fois dans la littérature, en 1966, pour décrire un processus de mort cellulaire contrôlant le développement de la queue de têtard (Tata 1966). Dans les années qui suivirent, l'utilisation d'un nouvel organisme modèle, le nématode *Caenorhabditis elegans*, permit une première caractérisation de la MCP (Brenner 1974, Ellis and Horvitz 1986, Hedgecock *et al.* 1983, Sulston 1976). Ces recherches, récompensées par un prix Nobel en 2002, ont montré que la MCP est un processus de mort cellulaire actif, contrôlé génétiquement et indispensable au développement normal de *C. elegans*.

Nous savons maintenant que la MCP est un mécanisme ubiquitaire au cours duquel des voies de signalisations finement contrôlées sont activées, entraînant une dégradation active de la cellule. En permettant la destruction des cellules non désirées ou endommagées, la MCP est indispensable à la vie et au développement des organismes multicellulaires. Lors du développement embryonnaire des mammifères, par exemple, la MCP est indispensable pour la formation de la lumière intestinale (O'Brien *et al.* 2002) et pour la suppression des cellules interdigitales, ce qui permet la séparation des doigts (Figure 24) (Hernandez-Martinez and Covarrubias 2011). Par ailleurs, une altération de la MCP peut être impliquée dans l'apparition de maladies auto-immunes ou de cancers (Portt *et al.* 2011, Zhivotovsky and Orrenius 2010), et les voies de signalisations la régulant constituent des cibles pour les thérapies anticancéreuses (Fulda 2014, Hassan *et al.* 2014).

La MCP n'est pas un mécanisme propre aux eucaryotes multicellulaires. En effet, des formes de MCP se retrouvent chez des eucaryotes unicellulaires (Ameisen *et al.* 1995) et chez des bactéries (Engelberg-Kulka *et al.* 2006). Par exemple, au sein de populations bactériennes, des conditions environnementales stressantes conduisent à une auto-destruction « altruiste » de certaines bactéries, ce qui permet la survie de la colonie (Engelberg-Kulka *et al.* 2006).

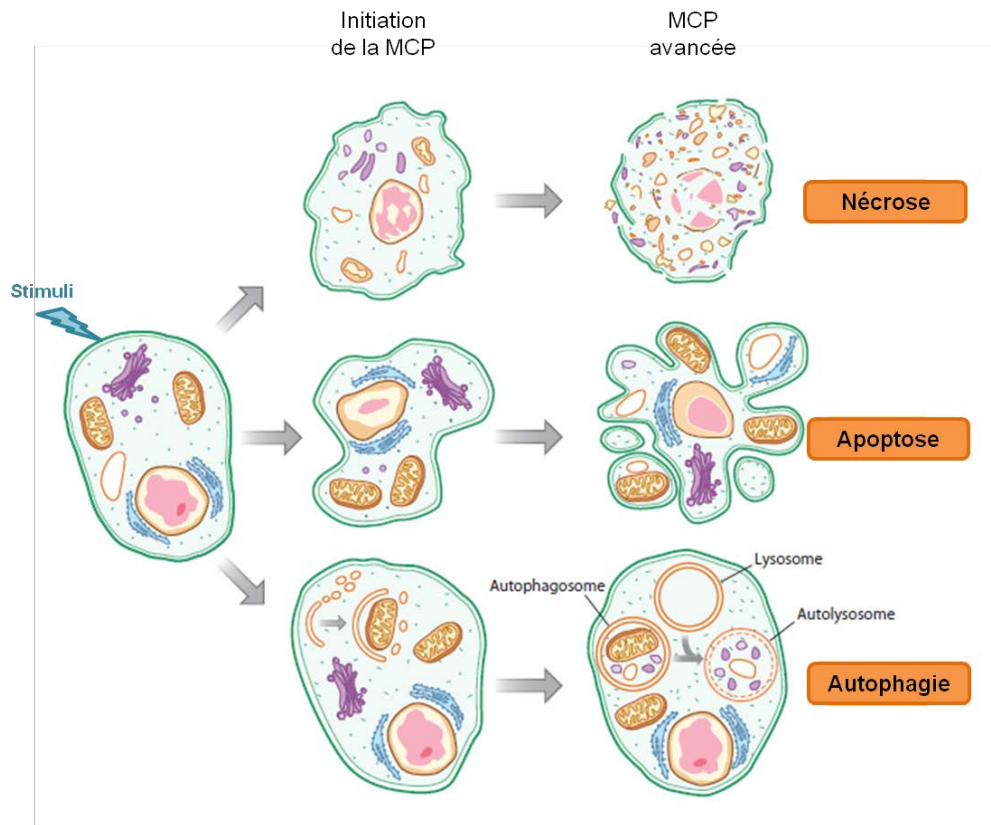
Les études concernant la MCP abondent dans la littérature et le but de cette partie n'est pas d'en faire un état des lieux exhaustif mais plutôt de se concentrer sur les plantes, organismes étudiés au cours de ma thèse. Pour cela, nous verrons que la MCP joue de nombreux rôles tout au long de la vie des plantes (§1.2). Les voies de signalisation et les mécanismes régulant la MCP au cours de la réaction hypersensible (« Hypersensitive Response » - HR) seront plus particulièrement détaillés (§2). Mais avant d'évoquer les fonctions de la MCP dans les plantes, intéressons nous d'abord aux marqueurs cellulaires caractérisant ce processus et aux acteurs généraux impliqués dans la plupart des formes de MCP chez les plantes (§1.1).





**Figure 24. Un exemple de MCP: la suppression des cellules interdigitales.**

Chez les mammifères, au cours de l'embryogenèse, l'induction de la MCP des cellules interdigitales (points rouges) permet la séparation des doigts. Selon les espèces, la disparition de ces cellules est plus ou moins prononcée formant ainsi des membres plus ou moins palmés



**Figure 25. Les trois formes de MCP chez les animaux (modifié d'après Dickman et Fluhr 2013).**

Chez les animaux, trois formes de MCP se différenciant par des caractéristiques cytotogiques et par des voies de signalisation différentes ont été identifiées : la nécrose, l'apoptose et l'autophagie. Au cours de l'autophagie, les constituants cellulaires sont entourés d'une membrane, pour former l'autophagosome. Celui-ci fusionne ensuite avec un lysosome, contenant des enzymes lytiques, pour former l'autolysosome où les constituants cellulaires vont être dégradés.

## 1. Caractéristiques et fonctions de la MCP chez les plantes

Le terme « apoptose », introduit en 1972 Kerr *et al.* (1972), était synonyme de MCP chez les animaux. Il désignait une forme de mort cellulaire différente de la nécrose, considérée jusqu'à récemment comme un processus de mort passif et non contrôlé (Fietta 2006). Cependant, des travaux plus récents ont bouleversé ce dogme en montrant que la nécrose est également une forme programmée de mort cellulaire (Hitomi *et al.* 2008). Actuellement, trois formes majoritaires de MCP sont considérées chez les animaux (Figure 25) (Kroemer *et al.* 2009) : l'apoptose, l'autophagie et la nécrose.

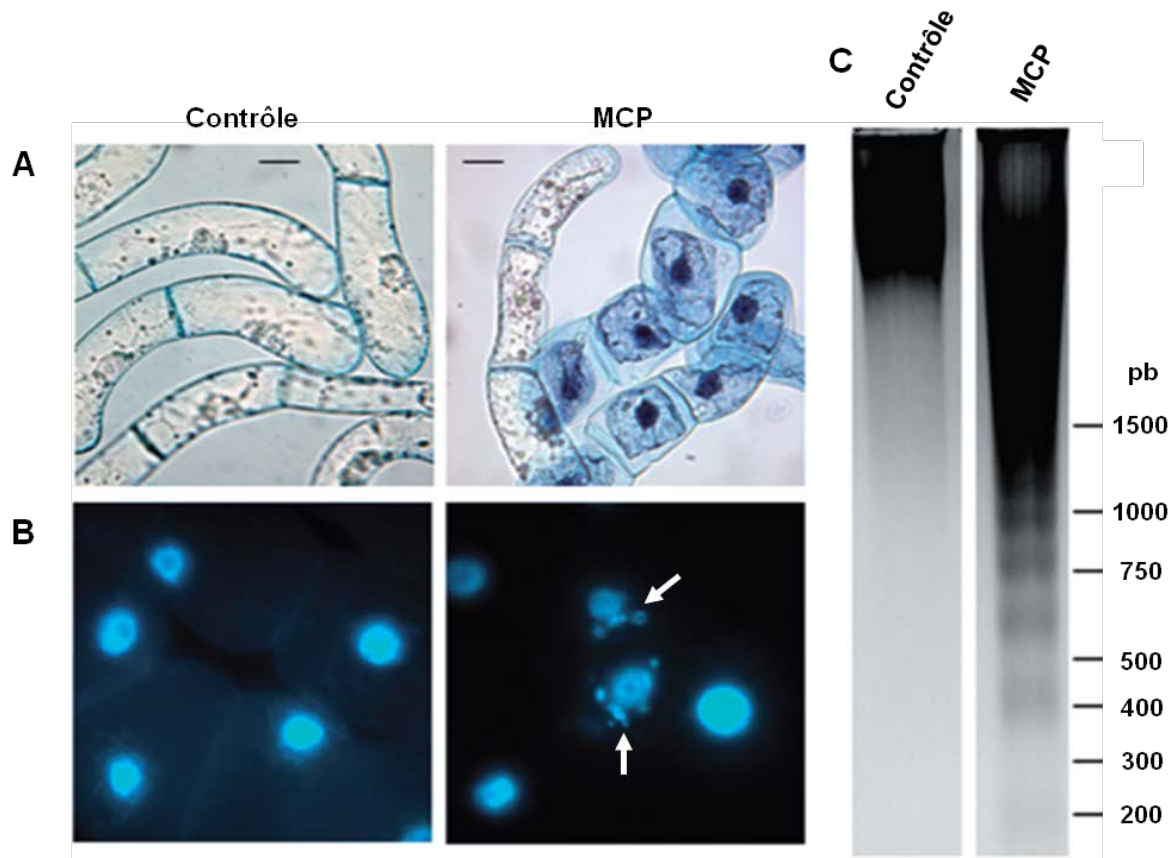
L'**apoptose**, la forme de MCP la plus étudiée chez les animaux, est caractérisée par des perturbations cellulaires drastiques conduisant à une fragmentation de la cellule en corps apoptotiques, qui sont ensuite phagocytés par d'autres cellules (Taylor *et al.* 2008). Cette forme « propre » de MCP évite le relargage du contenu cellulaire dans le milieu intracorporel et prévient ainsi l'induction de réponses immunes non désirées.

L'**autophagie**, déclenchée par de nombreux stress comme une déplétion de nutriments dans le milieu, se caractérise par la formation de grandes vésicules nommées autophagosomes. Ces autophagosomes permettent la dégradation et le recyclage de composés cellulaires. L'autophagie peut conduire à la survie de la cellule mais également à la mort de celle-ci en cas de stress trop intense (Kroemer and Levine 2008).

La **nécrose** se caractérise par une augmentation du volume cellulaire, un gonflement des organites, et au final par une rupture de la membrane plasmique, libérant ainsi le contenu cellulaire dans le milieu, ce qui peut conduire à des réponses inflammatoires (Kroemer *et al.* 2009).

Cette classification n'est pas retrouvée chez les plantes. En effet, même si la membrane plasmique peut se détacher de la paroi et conduire à une condensation cellulaire (Figure 26A) (Hiraga *et al.* 2010), aucun corps apoptotique n'a pu être observé et il n'existe aucun phagocyte pour les détruire. Le terme d'apoptose ne peut donc être utilisé pour évoquer la MCP dans le règne végétal. De plus, même si certaines formes de MCP ont été apparentées à de la nécrose (van Doorn *et al.* 2011) ou à de l'autophagie (van Doorn 2011), la MCP présente des caractéristiques cellulaires très variées chez les plantes, en fonction du stimulus ou de l'organe dans lequel elle survient. Les effecteurs et les voies de signalisation sont moins bien identifiés et présentent peu d'homologie avec les animaux. Ainsi, la classification des différentes formes de MCP chez les plantes est sujette à de nombreuses discussions (Reape and McCabe 2008, van Doorn 2011, van





**Figure 26. Quelques caractéristiques de la MCP chez les plantes (modifié d'après De Pinto *et al.* 2012).**

Au cours de la MCP chez les plantes, la membrane plasmique peut se détacher de la paroi et le cytoplasme se condenser (A). Il est également observé une condensation et une fragmentation de la chromatine visible grâce à l'utilisation d'un fluorochrome marquant l'ADN (flèches B), ainsi qu'un clivage de l'ADN en petits fragments observable par gel d'électrophorèse (C). Les photographies représentent des cellules de tabac en culture (A et B) dont la MCP a été induite (MCP) ou non (Contrôle). L'ADN a été extrait à partir de cellules de tabac en culture (C). pb : paires de bases.

Doorn *et al.* 2011, van Doorn and Woltering 2005), mais aucun consensus n'est actuellement admis par la communauté internationale.

Dans la suite de cette partie, seul le terme MCP sera donc utilisé sans tentative de classification. La MCP chez les plantes sera décrite au niveau cellulaire en évoquant certains des marqueurs et des effecteurs identifiés (§1.1), puis le rôle de ce processus au cours de la vie des plantes sera abordé (§1.2).

## **1.1. Les marqueurs et les acteurs de la MCP chez les plantes**

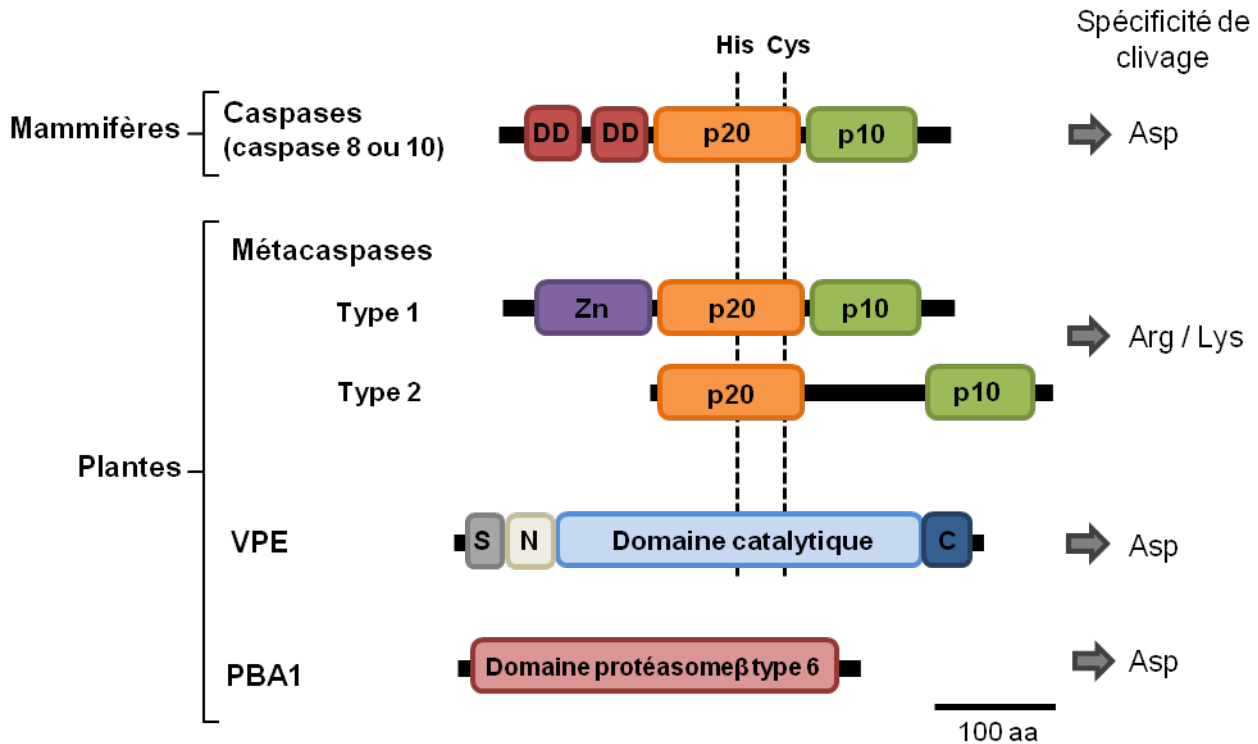
### **1.1.1. Condensation et clivage de l'ADN nucléaire**

La condensation du noyau, la fragmentation de la chromatine qui se répartit ensuite en périphérie du noyau et le clivage de l'ADN en petits fragments sont des marqueurs bien connus de la MCP, communs aux animaux et aux plantes (Figure 26B) (van Doorn and Woltering 2005). Le marquage de l'ADN par des molécules fluorescentes, la technique TUNEL, ou encore la visualisation du clivage de l'ADN sur un gel d'électrophorèse (Figure 26C), sont différentes approches utilisées pour détecter la MCP.

Les enzymes BFN1 (BIFUNCTIONAL NUCLEASE 1) et ZEN1 (ZINIA ENDONUCLEASE 1) sont les premières endonucléases, identifiées chez les plantes, impliquées dans la dégradation de l'ADN au cours de la MCP (Aoyagi *et al.* 1998, Perez-Amador *et al.* 2000). Ces deux protéines appartiennent au groupe des endonucléases de type S1, qui seraient spécialisées dans le clivage de l'ADN lors de la MCP chez les plantes (Lesniewicz *et al.* 2013, Sakamoto and Takami 2014).

### **1.1.2. Activité protéolytique de type caspase**

Lors de l'apoptose chez les animaux, des endonucléases sont clivées et activées par des protéases particulières : les caspases (« Cysteine-containing Aspartate-specific proteases ») (Enari *et al.* 1998). Les caspases possèdent une cystéine et une histidine dans leurs sites catalytiques et clivent leurs cibles au niveau d'un acide aspartique (Figure 27). Chez l'Homme, 13 caspases jouent un rôle central dans la régulation de l'apoptose en agissant à la fois comme des initiateurs et des effecteurs (McIlwain *et al.* 2013). Chez les plantes, l'analyse des génomes n'a pas permis d'identifier clairement des homologues des caspases animales par simple comparaison de séquences (Sanmartin *et al.* 2005). Cependant, des activités protéases similaires aux activités protéolytiques des caspases animales ont été détectées lors de l'activation de la MCP chez les plantes et des inhibiteurs d'activité caspase sont capables d'agir sur la MCP végétale (del Pozo



**Figure 27. Structure de caspases de mammifères, des métacaspases et des protéines VPEs et PBA1 à activité caspase chez les plantes (d'après Coll *et al.* 2011, Sanmartin *et al.* 2005).**

Chez les plantes, les métacaspases sont les protéines présentant le plus d'homologie avec les caspases animales. Les protéases VPEs possèdent une activité caspase identique à la caspase 1 des mammifères, bien que ces enzymes présentent très peu de ressemblances/d'identité de séquence avec les protéines animales. De même, la sous-unité PBA1 du protéasome présente une activité caspase, similaire celle de la caspase 3. Les positions de l'histidine et de la cystéine, acides aminés importants pour l'activité catalytique, sont représentées.

Arg : Arginine ; Asp : Acide aspartique ; C : Domaine inhibiteur Carboxylique ; DD : « Death Domain » ; Lys : Lysine ; N : Domaine N-terminal ; p10 et p20 : Domaines catalytiques (ou putatifs) caspases ; PBA1 : « 20S proteasome  $\beta$  subunit 1 » ; S : Peptide Signal ; VPE : « Vacuolar Processing Enzyme » ; Zn : Domaine doigt Zinc.

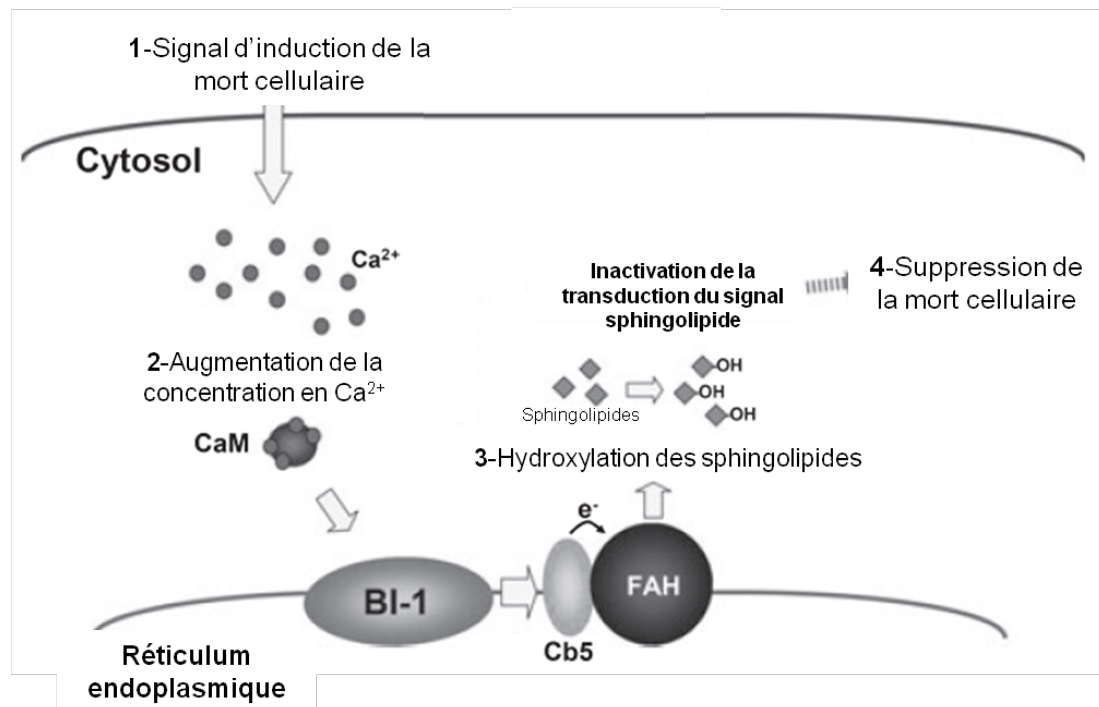
and Lam 1998, Watanabe and Lam 2004). Des approches pharmacologiques ont également permis de mettre en évidence que les enzymes VPE (« Vacuolar Processing Enzyme »), préalablement connues pour leur rôle dans la maturation des protéines de stockage de la graine (Hara-Nishimura *et al.* 1993), possèdent une activité caspase, identique à celle de la Caspase 1 humaine (Figure 27) (Hatsugai *et al.* 2004). Les VPE sont nécessaires au développement de la MCP chez le tabac et *Arabidopsis* (Hatsugai *et al.* 2004, Kuroyanagi *et al.* 2005). Enfin, une activité similaire à celle de la Caspase 3 animale est également détectée chez les plantes en cas d'induction de la mort. La sous-unité PBA1 (« 20S proteasome  $\beta$  subunit 1 ») du protéasome, complexe protéique impliqué dans la dégradation des protéines chez les eucaryotes, serait responsable de cette activité caspase (Figure 27) (Hatsugai *et al.* 2009).

Les métacaspases représentent une autre famille de protéases fonctionnelles dans la MCP chez *Arabidopsis*. Tout comme les caspases, ce sont des protéases à cystéines, mais elles sont relativement éloignées des caspases animales (Uren *et al.* 2000). De plus, ces protéines ne possèdent pas d'activité caspase stricte, puisqu'elles hydrolysent les protéines au niveau d'arginines ou de lysines et non au niveau d'acides aspartiques (Tsiatsiani *et al.* 2011). Chez *Arabidopsis*, deux types de métacaspases (type I et type II) possédant un domaine catalytique conservé mais divergeant au niveau de leur domaine N-terminal ont été identifiés (Figure 27). Leur implication comme des régulateurs positifs dans la MCP a été démontrée (Coll *et al.* 2010, He *et al.* 2008, Vercammen *et al.* 2004, Watanabe and Lam 2011), à l'exception de la protéine MC2/MCP1c (Metacaspase2/Metacaspase1c) qui serait un régulateur négatif de la mort chez *Arabidopsis* (Coll *et al.* 2010).

*Ainsi, bien que des millions d'années d'évolution ne permettent plus d'identifier les acteurs de la MCP par simple homologie de séquence, ces indices plaident en faveur d'une conservation des mécanismes entre les plantes et les animaux.*

### 1.1.3. Relargage du cytochrome c et protéines de la famille BCL-2

Au cours de l'apoptose, le cytochrome c situé dans l'espace intermembranaire mitochondrial est relargué dans le cytosol, où il se lie avec la protéine Apaf-1 (« Apoptotic protease-activating factor 1 ») pour former un complexe protéique appelé apoptosome. La formation de ce complexe est un point de non retour puisqu'il active les caspases (Taylor *et al.* 2008). Bien qu'il n'y ait aucune preuve de la formation de l'apoptosome au cours de la MCP chez



**Figure 28. Modèle de la suppression de la MCP par Bax Inhibitor-1 (modifié d'après Nagano *et al.* 2009).**

Un signal induisant la mort cellulaire (1) provoque une augmentation de la concentration en  $\text{Ca}^{2+}$  cytosolique (2). La calmoduline, qui lie le calcium, interagit avec BI-1, menant à l'association entre BI-1 et le complexe contenant le cytochrome b5 et FAH, au niveau de la membrane du réticulum endoplasmique. Il s'en suit une hydroxylation des sphingolipides (3) par FAH menant à l'inactivation du signal médié par les céramides conduisant à la mort cellulaire (4).

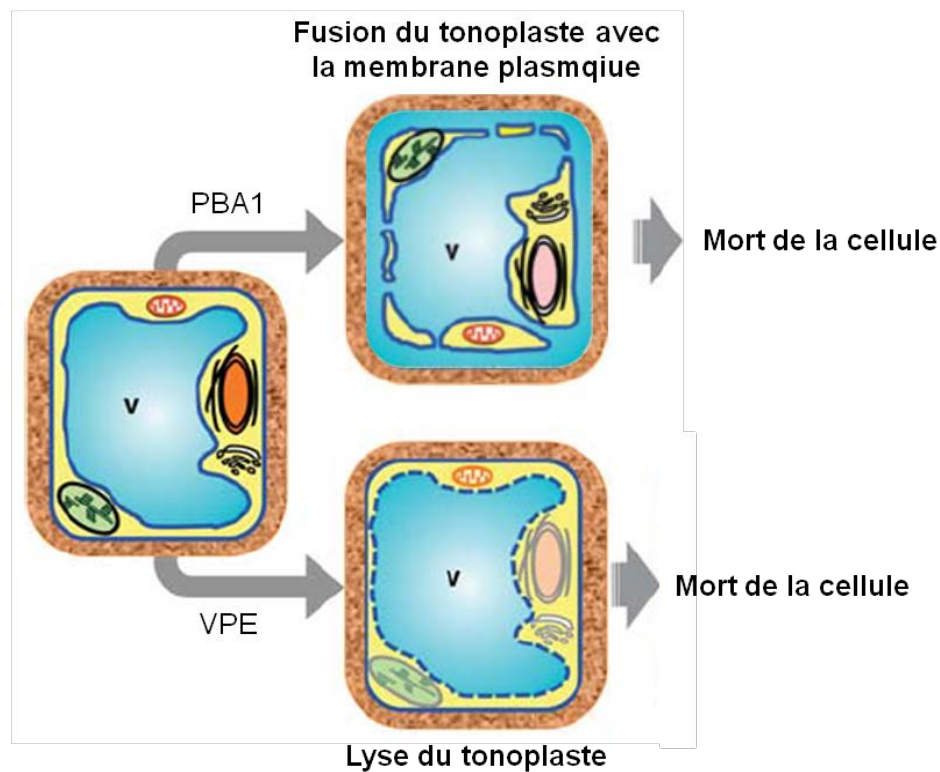
BI-1 : Bax Inhibitor-1 ; CaM : Calmoduline ; Cb5 : Cytochrome b5 ; FAH : Fatty acid 2-hydroxylase.

les plantes, le relargage du cytochrome c a bien été mis en évidence (Andronis and Roubelakis-Angelakis 2010, Vacca *et al.* 2006).

Dans les cellules animales, la perméabilisation de la membrane mitochondriale externe permettant le relargage du cytochrome c est régulée par les protéines de la famille BCL-2 (Taylor *et al.* 2008). Cette famille protéique se compose de facteurs pro-apoptotiques, telle que la protéine BAX (BCL2-ASSOCIATED X), et anti-apoptotiques, comme la protéine BCL-2. Les facteurs anti-apoptotiques et pro-apoptotiques sont antagonistes, et l'équilibre entre les deux est crucial pour réguler l'apoptose (Taylor *et al.* 2008). De manière surprenante, alors que les génomes des plantes ne présentent pas d'homologues des gènes de la famille BCL-2, l'expression ectopique du gène BAX chez le tabac ou *Arabidopsis* induit spontanément de la MCP (Kawai-Yamada *et al.* 2001, Lacomme and Santa Cruz 1999). Ces données, associées à celles concernant les caspases indiquent que la protéine BAX INHIBITOR-1 (BI-1) pourrait être un de ces facteurs communs conservés entre les différents règnes.

#### 1.1.4. Bax inhibitor-1 et le réticulum endoplasmique

La protéine BI-1 est un suppresseur de mort cellulaire très conservé, inhibant l'action de BAX, qui se retrouve chez les animaux, les champignons et les plantes (Henke *et al.* 2011). Chez *Arabidopsis*, la surexpression de *BI-1* inhibe la MCP provoquée par l'expression ectopique du gène *BAX*, et inversement la désactivation du gène *BI-1* dans un mutant *bi-1* conduit à une forte propagation de la MCP induite par des pathogènes (Kawai-Yamada *et al.* 2001, Watanabe and Lam 2006). BI-1 est une protéine transmembranaire localisée au niveau du réticulum endoplasmique (RE) qui interagit avec une calmoduline et pourrait former un canal calcique dans la membrane du RE (Bultynck *et al.* 2012, Ihara-Ohori *et al.* 2007, Kim *et al.* 2008a). BI-1 interagit avec un complexe, également situé dans la membrane du RE, composé du cytochrome b5 et de FAH (FATTY ACID 2-HYDROXYLASE), enzyme impliquée dans l'hydroxylation des sphingolipides (Nagano *et al.* 2009). Il est supposé que via ces interactions, suite à une augmentation du  $\text{Ca}^{2+}$  cytosolique, BI-1 conduit *in fine* à une hydroxylation des sphingolipides, supprimant ainsi la mort cellulaire (Figure 28). Nous verrons par la suite que la signalisation calcique et l'accumulation de sphingolipides jouent toutes deux un rôle important dans l'induction de la MCP (§2.1.)



**Figure 29. La vacuole libère de deux manières différentes des enzymes lytiques au cours de la MCP (modifié d'après Hara-Nishimura *et al.* 2011).**

En fonction des stimuli et de l'organe, la vacuole peut libérer les enzymes lytiques qu'elle contient de deux manières différentes. Dans un premier cas, le tonoplast peut se lyser libérant ainsi les enzymes directement dans le cytoplasme. Pour cela, l'activation de la protéase VPE est nécessaire. Dans un second cas, le tonoplast fusionne avec la membrane plasmique, ce qui libère le contenu vacuolaire dans le milieu extracellulaire. La fusion des deux membranes nécessiterait l'activité de PBA1. Les deux cas conduisent à la mort de la cellule.

PBA1 : « 20S proteasome  $\beta$  subunit 1 » ; VPE : « Vacuolar Processing Enzyme ».

### 1.1.5. La vacuole

La plupart des cellules végétales possèdent des vacuoles qui occupent une grande partie du volume cellulaire. Cette caractéristique constitue une particularité des cellules végétales. De manière similaire aux lysosomes chez les animaux, les plantes utilisent aussi des vacuoles lytiques pour recycler les composants (Muntz 2007). Par exemple, au cours du processus d'autophagie, des vésicules membranaires encapsulent des constituants cellulaires, formant ainsi des autophagosomes qui sont adressés à la vacuole et fusionnent avec la membrane vacuolaire, le tonoplaste (Michaeli *et al.* 2014). Une fois dans la vacuole, les constituants sont dégradés. En effet, les vacuoles lytiques peuvent contenir de nombreuses protéases, nucléases et autres enzymes lytiques, et également des composés permettant de lutter contre les pathogènes (Hara-Nishimura and Hatsugai 2011). Ces caractéristiques font que la vacuole est impliquée dans la dégradation des composants cellulaires lors de la MCP, mais il faut avant tout qu'elle puisse libérer son contenu. Pour cela, deux processus ont été mis en évidence (Hara-Nishimura and Hatsugai 2011).

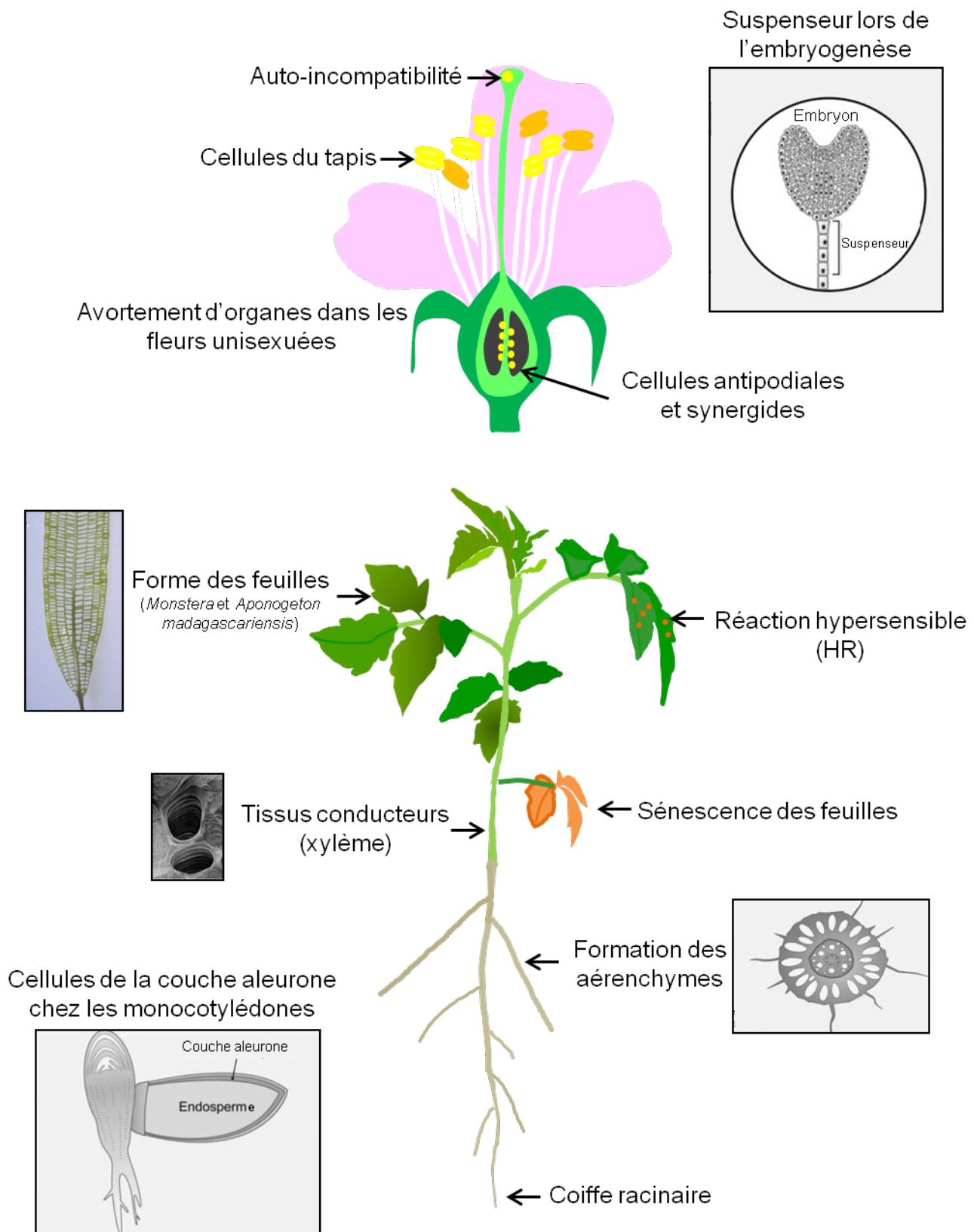
Dans le premier cas, le tonoplaste est rompu, ce qui conduit à une libération rapide des enzymes lytiques dans le cytosol (Figure 29). Il s'ensuit une dégradation de l'ADN nucléaire, des organites et de tous les composants cellulaires. Les enzymes VPE, se localisant dans la vacuole, ont un rôle essentiel dans ce processus. Elles sont nécessaires à la maturation des enzymes lytiques situées dans la vacuole, et à la dégradation du tonoplaste (Hatsugai *et al.* 2006).

Dans le second cas, le tonoplaste fusionne avec la membrane plasmique, libérant ainsi le contenu de la vacuole dans le milieu extracellulaire (Figure 29) (Hara-Nishimura and Hatsugai 2011). La sous-unité PBA1 du protéasome est nécessaire à la fusion des membranes. En effet, des traitements avec des inhibiteurs de l'activité de PBA1 empêchent la fusion du tonoplaste avec la membrane plasmique et ainsi le relargage du contenu vacuolaire (Hatsugai *et al.* 2009). Ces événements sont habituellement observés en cas d'attaque par des pathogènes, certains composés vacuolaires pouvant permettre aux cellules de se défendre. Cependant, les mécanismes sous-jacents conduisant à la mort ne sont pas encore clairement élucidés.

Il faut noter que la rupture du tonoplaste peut se produire précocement ou tardivement, et que sa fusion avec la membrane plasmique n'est pas toujours observée (van Doorn *et al.* 2011). Ces deux critères ne sont donc pas suffisants pour différencier deux types de MCP chez les plantes.

*La MCP chez les plantes présente de nombreuses similarités avec celle décrite chez les animaux. Des protéines de type caspase régulent son déroulement, et les mitochondries ainsi que le RE jouent des rôles fondamentaux. Cependant, les divergences évolutives font que les*





**Figure 30. Quelques exemples de MCP au cours de la vie des plantes (d'après Gunawardena *et al.* 2004, Gadjev *et al.* 2008, Roberts et McCann 2000, Taylor *et al.* 2012).**

*mécanismes connus chez les animaux ne peuvent être appliqués tels quels aux végétaux. Le rôle de la vacuole centrale, propre au règne végétal, en est un bon exemple. Même si les mécanismes régulant ces processus commencent à être bien déchiffrés, notamment lors de la HR, de nombreux régulateurs et effecteurs centraux restent à identifier.*

## **1.2. Fonctions dans la plante**

La MCP est un processus de différenciation cellulaire dont le point final est la mort de la cellule. Il agit tout au long de la vie de la plante, lors du développement des organes, et également lors de stress abiotiques ou biotiques (Figure 30).

La coiffe racinaire entoure et protège le méristème racinaire qui assure le développement du système racinaire. Ce tissu peut être divisé en 2 zones : la columelle centrale et la coiffe racinaire latérale (« Lateral Root Cap » – LRC) (Arnaud *et al.* 2010). Les cellules de ces 2 zones sont continuellement formées à partir des cellules initiales du méristème. De ce fait, les couches cellulaires s'accumulent jusqu'à ce que la couche extérieure se détache de la coiffe par feuillet, plus particulièrement les cellules de la LRC, comme lors d'une mue. Par ce mécanisme, la coiffe racinaire est régulièrement renouvelée et elle est maintenue à une taille constante. La différenciation des cellules de la coiffe qui conduit à leur mort est régulée par le processus de MCP. Au niveau de la LRC, il semblerait que la MCP soit initiée par le facteur de transcription SMB/ANAC033 (SOMBRERO/ARABIDOPSIS NAC DOMAIN CONTAINING PROTEIN 033), puis que l'endonucléase BFN1 soit nécessaire à la dégradation des composants cellulaires (Fendrych *et al.* 2014).

Le xylème est un tissu conducteur, permettant le transport de la sève brute dans la plante, via des éléments conducteurs qui sont des cellules mortes. La différenciation des éléments conducteurs du xylème commence par la formation d'une paroi secondaire, qui ensuite se lignifie pendant que le processus de MCP se déroule. Les composants cellulaires sont dégradés suite à la rupture du tonoplaste qui libère ainsi les enzymes lytiques stockées dans la vacuole, puis la paroi est perforée aux extrémités des cellules (Escamez and Tuominen 2014). L'ensemble du processus de différenciation des cellules du xylème est régulé par les facteurs de transcriptions VND6 et 7 (VASCULAR RELATED NAC DOMAIN 6 et 7) chez *Arabidopsis* (Kubo *et al.* 2005), tandis que l'endonucléase ZEN1 (Ito and Fukuda 2002) et la métacaspase MC9 (Bollhoner *et al.* 2013), respectivement chez *Zinnia elegans* et *Arabidopsis*, sont impliquées dans la dégradation des composants cellulaires.

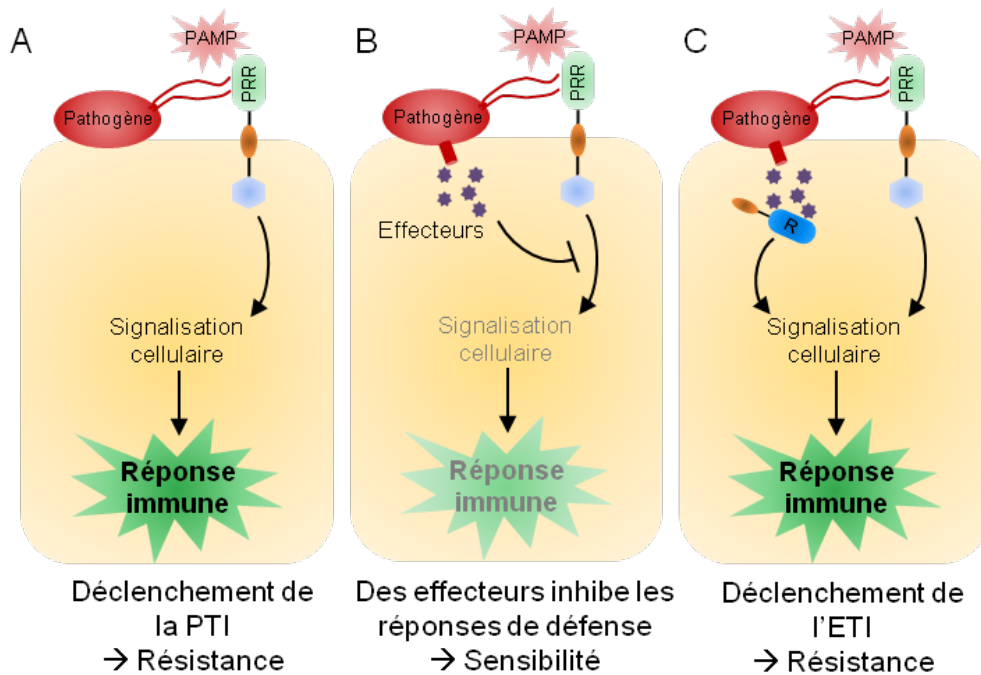


Les aérénchymes correspondent à d'autres conduits permettant le transport de gaz, et qui sont construits par MCP. Ils se forment dans les racines et les tiges des plantes de zones humides, délivrant le dioxygène (O<sub>2</sub>) dans la rhizosphère inondée et permettant la libération des gaz produits par ces organes (CO<sub>2</sub>, éthylène, méthane) (Colmer 2003).

La production de formes complexes de feuilles durant la morphogenèse foliaire implique également la MCP et certaines des espèces concernées sont devenues des modèles d'étude de ces phénomènes. Il s'agit par exemple des limbes foliaires fragmentés des plantes du genre *Monstera* (Gunawardena *et al.* 2005) ou encore de la formation de nombreuses perforations observées sur les feuilles de la « dentelle de Madagascar » (*Aponogeton madagascariensis*), une plante aquatique (Gunawardena *et al.* 2004).

La MCP intervient également au cours de la phase de reproduction chez les angiospermes. Par exemple, chez la plante dioïque *Vitis vinifera*, les fleurs unisexuées sont à l'origine bisexuées. Dans les fleurs mâles, la MCP provoque la dégradation du pistil déjà développé, alors que ce processus détruit les étamines dans les fleurs femelles (Caporali *et al.* 2003). Au sein des anthères, le développement correct des microspores qui donneront les grains de pollens nécessite la mort des cellules du tapis, qui libèrent ainsi des éléments nutritifs. Ceci implique l'action de la protéase à cystéine CEP1 (CYSTEIN ENDOPEPTIDASE 1) (Zhang *et al.* 2014) chez *Arabidopsis*, et l'action de nombreux facteurs de transcription (Feng *et al.* 2012, Millar and Gubler 2005, Xu *et al.* 2010b). De plus, la MCP est impliquée dans les mécanismes d'auto-incompatibilité, empêchant l'autofécondation ou les fécondations entre génotypes très proches. Chez le pavot (*Papaver rhoeas*), le pollen incompatible voit son développement arrêté en raison de l'induction de MCP (Thomas and Franklin-Tong 2004), médiée par des activités de type caspase (Bosch *et al.* 2008). Chez la plupart des plantes à fleurs, les trois cellules antipodales et les deux cellules synergides du gamétophyte femelle meurent lors de la fécondation. Les mécanismes conduisant à la dégénérescence de ces cellules commencent à être élucidés, et il est de plus en plus évident qu'ils impliquent des processus de MCP (Heydlauff and Gross-Hardt 2014).

Au cours de l'embryogenèse, le suspenseur assure l'acheminement des nutriments et la synthèse de phytohormones (Kawashima and Goldberg 2010). La différenciation de ce tissu conduit *in fine* à sa dégradation par l'induction de MCP, au cours de laquelle il peut être observé la lyse de la vacuole, l'induction d'activités caspases et l'action de métacaspases (Smertenko and Bozhkov 2014). Chez les céréales, la MCP est également un processus essentiel pour le développement et la germination des graines caractérisé par la couche aleurone qui produit des enzymes amylases permettant la remobilisation de l'amidon. Suite à l'induction de MCP, cette



**Figure 31. Représentation simplifiée des réponses immunitaires chez les plantes (d'après Pieterse et al. 2009).**

Lors de l'attaque d'un pathogène, les PAMP sont reconnus par les récepteurs PRR qui activent des voies de signalisations déclenchant la PTI, et permettant à l'hôte de résister. Cependant, des pathogènes possèdent des effecteurs qui inhibent la PTI, ce qui conduit à la sensibilité de la plante. Les plantes ont acquis des protéines R qui reconnaissent ces effecteurs et induisent l'ETI.

ETI : « Effector-Triggered Immunity » ; PAMP : « PAMP-Triggered Immunity » ; PRR : « Pattern-Recognition Receptor » ; Protéine R : protéine de Résistance ; PTI : « PAMP-Triggered Immunity ».

couche cellulaire finit par disparaître, et les constituants cellulaires sont utilisés par l'embryon en germination (Dominguez and Cejudo 2014).

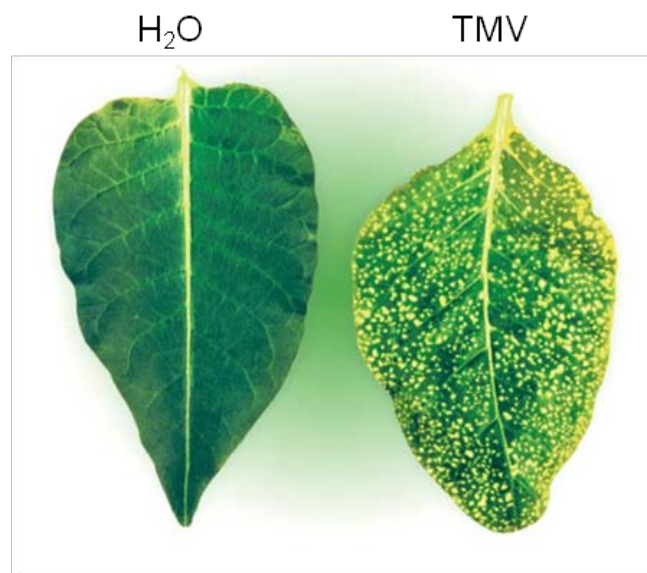
L'activation de MCP à grande échelle est également impliquée dans la sénescence des organes, tels que les feuilles (Guiboileau *et al.* 2010). Au cours de ce processus, les chloroplastes sont les premières cibles de nombreuses protéases (Roberts *et al.* 2012). L'activité de ces protéines et le processus d'autophagie (Avila-Ospina *et al.* 2014) permettent le recyclage des composants cellulaires, dont l'azote, qui seront redistribués aux autres organes de la plante. La MCP se déroulant au cours de la sénescence se termine par la rupture du tonoplaste et la dégradation des composés cellulaires pour provoquer la mort des cellules (van Doorn *et al.* 2011).

*Lors du développement des plantes, la destruction ciblée de cellules par la MCP est impliquée, par exemple, dans la protection de la pointe racinaire, dans le transport de la sève et parfois de gaz, dans la reproduction des plantes à fleurs, dans le développement et la germination des graines et dans la fin de vie d'organes et des plantes lors de la sénescence. De plus, la MCP est impliquée dans les réponses face aux stress abiotiques, comme l'hypoxie ou la sécheresse (Watanabe and Lam 2006), et également dans les réactions de défense face aux agents pathogènes, comme lors de la réaction d'hypersensibilité (HR).*

## **2. La HR, une MCP pour faire face aux agents pathogènes**

De longues périodes de coévolution entre les plantes et les microorganismes pathogènes ont conduit au développement de mécanismes offensifs et défensifs complexes. Du côté de l'hôte, l'immunité basale est une première ligne de défense. Elle repose sur la reconnaissance d'éléments très conservés mais spécifiques aux microorganismes pathogènes, tels que la flagelline, le peptidoglycane et la chitine. Lorsque ces éléments sont reconnus par les plantes et qu'ils induisent des réponses de défenses, ils sont alors appelés MAMPs ou PAMPs (pour « Microbe-Associated Molecular Patterns » ou « Pathogen-Associated Molecular Patterns »). Les réponses de défense induites par la perception des MAMPs et des PAMPs, sont alors appelées MTI ou PTI (« MAMP-Triggered Immunity » ou « PAMP-Triggered Immunity ») et sont considérées comme de l'immunité basale (Figure 31A) (Zipfel and Robatzek 2010).

Du côté des pathogènes, les facteurs de virulence (aussi nommés effecteurs) peuvent supprimer ce premier niveau de réponse des plantes (Figure 31B), provoquant le déclenchement d'une seconde ligne de défense. Celle-ci met en jeu des gènes de résistance (gènes R) dont les



**Figure 32. Un exemple de réaction hypersensible (d'après Hofius *et al.* 2007).**  
Feuilles de tabac inoculées avec de l'eau ou avec le virus de la mosaïque du tabac (TMV).

produits reconnaissent les effecteurs pathogènes et induisent une réponse spécifique, rapide et plus robuste que la PTI, nommée ETI (« Effector-Triggered Immunity ») (Figure 31C), et aboutit souvent à une réaction de HR (Wu *et al.* 2014).

La HR se traduit par la mort contrôlée des cellules de la plante hôte au niveau du site d'infection du pathogène (Figure 32) (Hofius *et al.* 2007). La mort des cellules végétales entourant l'agent pathogène perturberait fortement le développement de ce dernier. En effet, celui-ci se retrouve ainsi dans un milieu dépourvu d'éléments nutritifs, au pH défavorable, et contenant des composés toxiques libérés suite à la mort des cellules. De plus, la HR initierait un signal d'alarme informant les autres parties de la plante de l'attaque pathogène. Ce signal se propagerait dans toute la plante mettant en place une résistance systémique, appelée SAR (« Systemic Acquired Resistance »), ce qui confère à la plante une protection durable et à large spectre d'hôte.

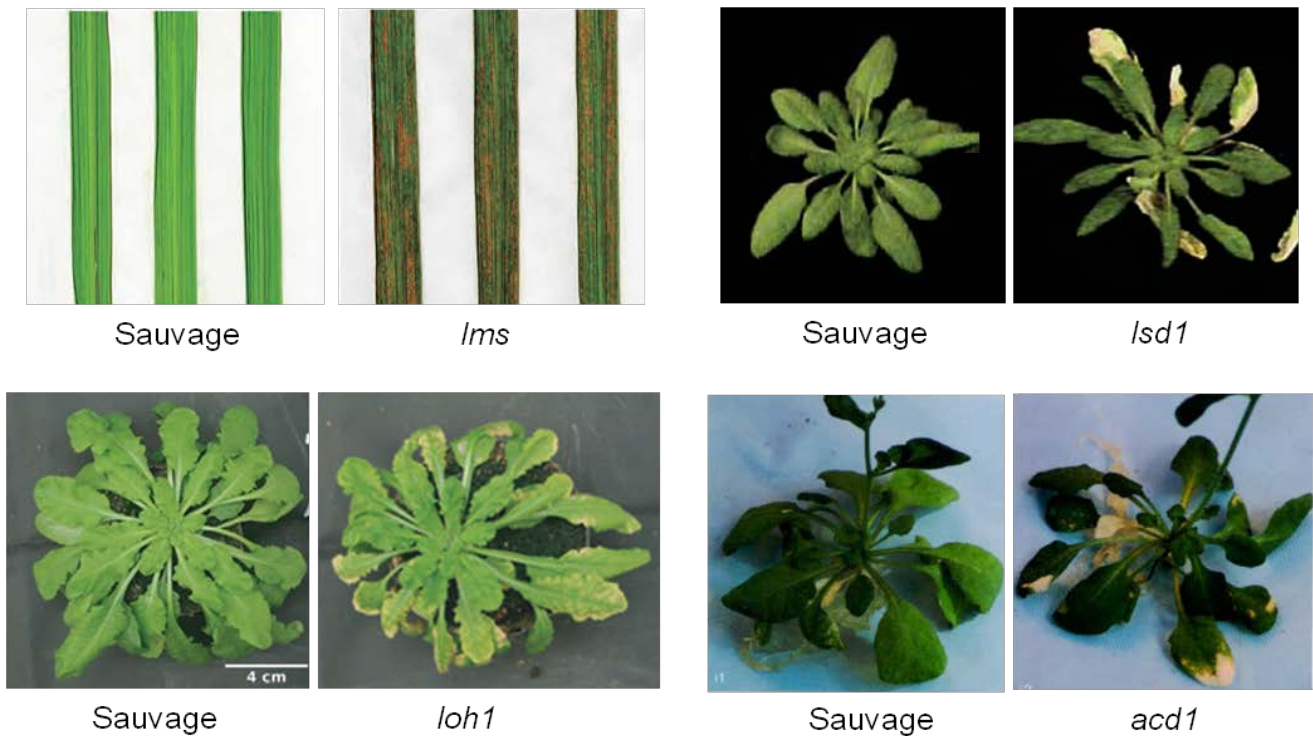
La HR est une forme de MCP. En effet, les cellules ne meurent pas à cause d'éléments toxiques sécrétés par le pathogène mais suite à l'induction de voies de signalisation complexes conduisant à l'activation d'acteurs à l'origine de la mort des cellules. Même si les mécanismes de la HR ne sont pas tout à fait compris, il est clair que celle-ci présente certaines caractéristiques de la MCP et qu'elle nécessite l'action de plusieurs des facteurs décrits précédemment. Par exemple, au cours de la HR, la mort des cellules surviendrait essentiellement suite à la fusion du tonoplaste avec la membrane plasmique et non suite à la lyse de celui-ci (Hara-Nishimura and Hatsugai 2011).

La réponse hypersensible s'avère être la forme de MCP la plus étudiée chez les plantes et les mécanismes responsables de sa mise en place seront abordés dans la suite de ce manuscrit<sup>1</sup>. Dans un premier temps, nous verrons comment des approches génétiques ont permis d'identifier des mutants développant des lésions de type HR, les « Lesion Mimic Mutants » (LMM). La caractérisation de ces mutants ainsi que celle des supprimeurs de ces mutants a été très fructueuse révélant l'existence de divers mécanismes, de régulateurs et d'acteurs impliqués dans la MCP chez les plantes (§2.1). L'action des phytohormones dans le contrôle de la HR sera ensuite abordée ensuite (§2.2) ainsi que les conséquences de l'activation de ce processus dans la plante (§2.3).

---

<sup>1</sup> Sachant que l'objectif de ma thèse n'était pas focalisé sur les mécanismes régulant la HR en cas d'interaction avec des agents pathogènes, mais plutôt de comprendre l'apparition spontanée de lésions, ressemblant à de la HR, l'aspect pathogène sera peu abordé.





**Figure 33. Quelques exemples des phénotypes de « Lesion Mimic Mutants » (d'après Greenberg et Ausubel 1993, Ternes *et al.* 2011, Torres *et al.* 2005, Undan *et al.* 2012).**

Les « Lesions Mimic Mutants » (LMM) sont des mutants se caractérisant par l'apparition spontanée de lésions sur leurs feuilles. LMMs chez *A. thaliana* (*acd1*, *loh1*, et *lsd1*) et *O. sativa* (*lms*).

*acd1* : *accelerated cell death 1* ; *lms* : *lesion mimic and senescence* ; *loh1* : *lag one homolog 1* ; *lsd1* : *lesion simulating disease 1*.

## 2.1. Les « Lesion Mimic Mutants » et leurs supresseurs

Les premiers « Lesion Mimic Mutants » (LMM) ont été identifiés chez le maïs il y a plus de trente ans (Hoisington *et al.* 1982) et la découverte de nombreux autres LMM chez *Arabidopsis*, le riz (*Oryza sativa*) et l'orge (*Hordeum vulgare*) s'en est suivi. Ils ont été nommés ainsi car ils développent spontanément, sur leurs feuilles, des lésions souvent comparées à celles observées lors de la HR (bien qu'il n'y ait souvent aucune preuve permettant de confirmer que les mécanismes mis en jeu sont identiques) (Figure 33). Ces mutants ont fortement suscité l'intérêt des chercheurs afin d'élucider les mécanismes de la MCP chez les plantes. Cependant, les LMM ont souvent été obtenus par une stratégie de génétique directe, et les gènes désactivés dans ces mutants sont longtemps restés inconnus. A partir des années 2000, le séquençage et l'annotation des génomes des plantes modèles, ont permis d'identifier les gènes mutés dans de nombreux LMMs. Ces avancées ont ensuite permis de déployer des stratégies de mutagenèses secondaires afin d'identifier des mutants supresseurs du phénotype « HR-like » des LMMs. L'ensemble des données acquises sur ce point a fait l'objet d'un article de revue présenté ci-après.



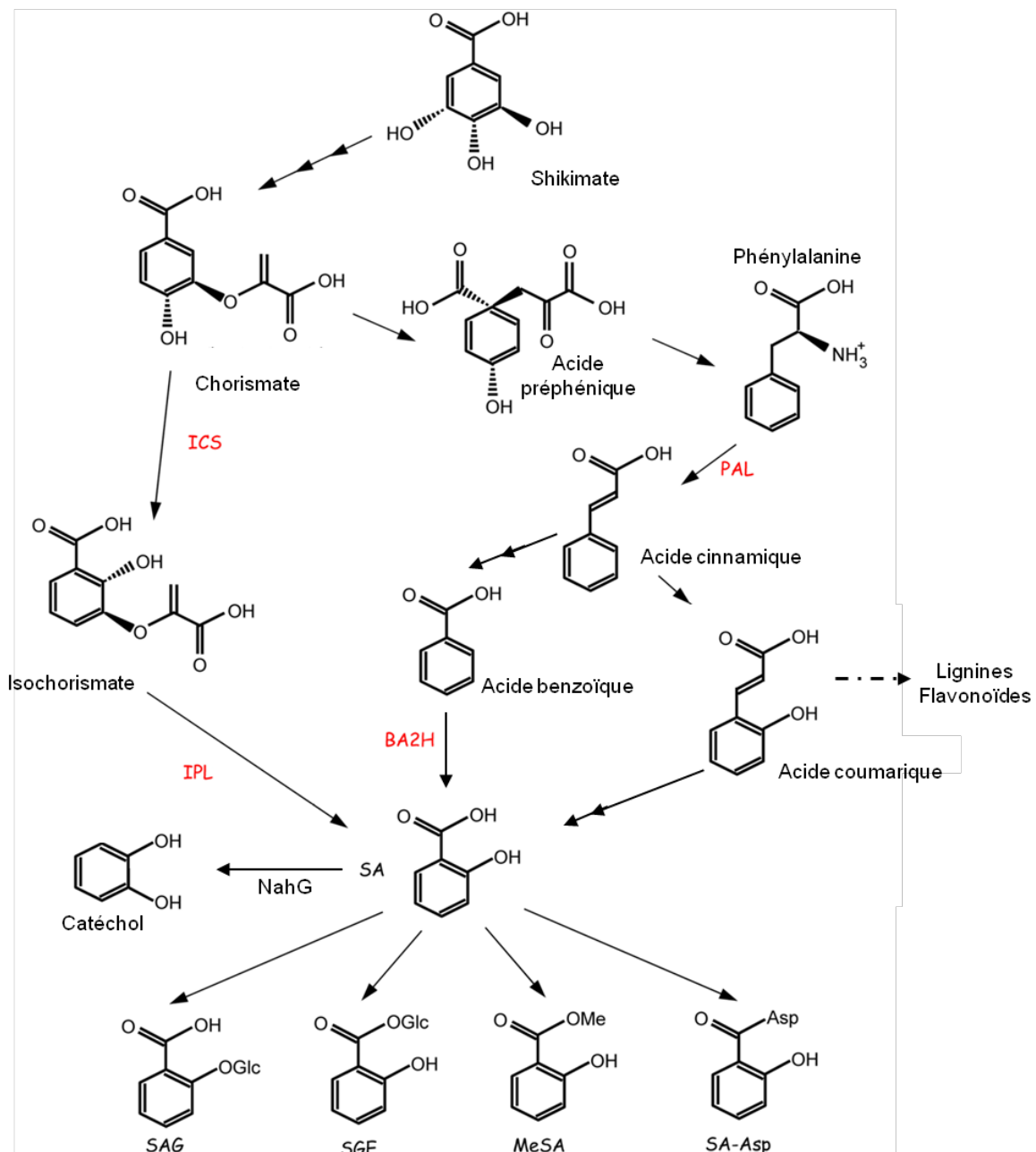
**Article 1: “To die or not to die ? Lessons from lesion mimic mutants”**

(Parution prévue courant 2015 dans “Frontiers in Plant Science”)

**Auteurs :** Quentin Bruggeman, Cécile Raynaud, Moussa Benhamed, et Marianne Delarue

**Résumé en français :**

La mort cellulaire programmée (MCP) est un processus ubiquitaire régulé génétiquement, qui consiste en l'activation de voies de signalisations finement contrôlées conduisant au suicide cellulaire. Bien que certains aspects de la régulation de la MCP semblent évolutivement conservés entre les plantes, les animaux et les champignons, l'importance de cette conservation reste controversée. Au cours des dernières décennies, dans le but de décortiquer les mécanismes de la MCP chez les plantes, l'identification et la caractérisation de plusieurs « Lesion Mimic Mutants » (LMM) ont constitué des outils très puissants. Grâce aux progrès de la génétique moléculaire, les mutations responsables des phénotypes d'un grand nombre de LMMs et de leurs supresseurs ont été localisées, et l'identification des gènes mutés a mis en lumière certains mécanismes majeurs impliqués dans la MCP tels que (i) l'implication des chloroplastes et de l'énergie lumineuse, (ii) le rôle des sphingolipides et des acides gras, (iii) la perception de signaux au niveau de la membrane plasmique nécessitant un trafic membranaire fonctionnel, (iv) des seconds messagers comme des flux ioniques et des espèces réactives de l'oxygène, et (v) le contrôle de l'expression des gènes comme dernier intégrateur des voies de signalisation.



**Figure 34. Voies de biosynthèse de l'acide salicylique (modifié d'après Miura et Tada 2014).**

Le SA peut être synthétisé à partir de l'isochorismate ou de la phénylalanine. Cependant, il semble que la voie débutant par l'isochorismate soit majoritaire puisque le mutant *sid2*, affecté dans le gène *ICS1*, présente une diminution drastique de la teneur en SA en réponse aux pathogènes. Le gène bactérien *NahG*, provenant de *Pseudomonas putida*, dégrade le SA en catéchol. Il peut être transfecté dans des plantes afin de créer des lignées altérées dans l'accumulation de SA. Le SA libre peut être conjugué pour former des dérivés.

BA2H : « Benzoic Acid 2-Hydroxylase » ; ICS : IsoChorismate Synthase ; IPL : Isochorismate Pyruvate Lyase ; MeSA : « Methyl Salicylate » ; PAL : Phénylalanine Amonia Lyase ; SA : « Salicylic Acid » ; SA-Asp : Salicyloyl-L-Aspartate ; SAG : « Salicylic Acid 2-O-β-Glucoside » ; SGE : Salicyloyl Glucose Ester.

## 2.2. Contrôle hormonal de la HR

Les plantes produisent de nombreuses hormones leur permettant de réguler et de coordonner la plupart des processus développementaux mais également les réponses face aux stress abiotiques et biotiques. Parmi ces phytohormones, trois jouent un rôle central dans la résistance et la mise en place de la HR : l'acide salicylique (SA), l'acide jasmonique (JA) et l'éthylène (ETH).

D'autres phytohormones présentent également des fonctions dans la résistance aux agents pathogènes, alors qu'elles sont habituellement connues pour agir dans le développement ou dans la résistance aux stress abiotiques. C'est le cas de l'auxine, des gibbérellines (GA), des brassinostéroïdes ou encore de l'acide abscissique (ABA) (Pieterse *et al.* 2012). Par exemple, l'auxine est importante dans l'établissement d'une SAR efficace (Truman *et al.* 2010), et les GA participent à la tolérance contre les agents pathogènes biotrophes et à la sensibilité contre les pathogènes nécrotrophes (Navarro *et al.* 2008). L'ABA a des rôles multiples dans la résistance des plantes aux agents pathogènes (Ton *et al.* 2009). Par exemple, en cas d'interactions entre *Arabidopsis* et des souches virulentes ou avirulentes<sup>1</sup> de *Pseudomonas syringae*, l'ABA est impliqué dans la fermeture des stomates empêchant ainsi l'entrée des pathogènes dans la plante (Melotto *et al.* 2006). Les rôles de ces différentes phytohormones ne seront pas plus amplement détaillés par la suite.

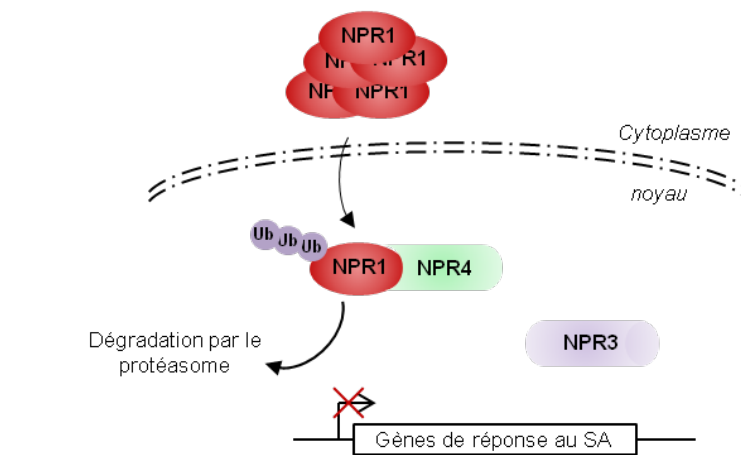
### 2.2.1. L'acide salicylique

La biosynthèse du SA dépend de deux voies : la voie des phénylpropanoïdes se déroulant dans le cytoplasme (Coquoz *et al.* 1998), qui est également responsable de la synthèse des lignines et des flavonoïdes (Humphreys *et al.* 1999), et la voie initiée par l'IsoChorismate Synthase (ICS), se localisant dans le chloroplaste (Figure 34) cette dernière étant la voie de synthèse majoritaire du SA (Strawn *et al.* 2007, Wildermuth *et al.* 2001). En effet, le mutant *sid2* (*salicylic acid induction deficient 2*), désactivé pour le gène *ICSI*, présente des teneurs en SA très réduites (Nawrath and Metraux 1999, Wildermuth *et al.* 2001). Une fois synthétisé, le SA peut rester sous forme libre active, ou être conjugué à d'autres molécules (Miura and Tada 2014). Le SA peut être glycosylé, formant du SAG (« Salicylic Acid 2-O-β-Glucoside »), ce qui le stabilise et lui permet d'être transporté dans la plante. Il peut également être méthylé, formant du MeSA

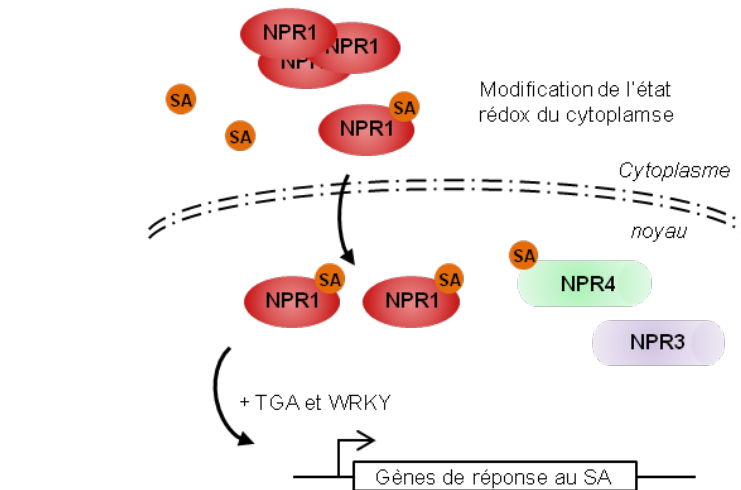
<sup>1</sup>Un pathogène virulent est capable d'infecter un hôte et de s'y propager. Au contraire, face à un pathogène avirulent, les plantes déclenchent des réponses de défenses rapides et spécifiques empêchant la propagation du microorganisme. Dans ce cas, le pathogène est porteur d'un gène d'avirulence (*Avr*) dont le produit est reconnu par une protéine R synthétisée par la plante, déclenchant ainsi des voies de signalisations qui mènent à la résistance de l'hôte.

Type de  
résistance

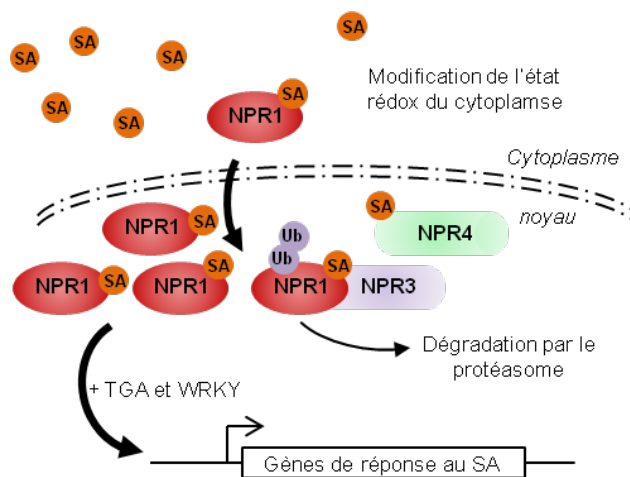
Basale



SAR



ETI



Concentration  
cellulaire en SA

Figure 35. Mécanismes de perception du SA par les protéines NPR, chez *Arabidopsis* (d'après Fu *et al.* 2012 ; Wu *et al.* 2012).

(Figure 34) (« Methyl SALicylate »). Le MeSA peut être produit par les feuilles de plantes attaquées par des insectes herbivores, la molécule attire alors des parasites infectant ces pathogènes (James and Price 2004).

Les protéines ENHANCED DISEASE SUSCEPTIBILITY 1 (EDS1), PHYTOALEXIN DEFICIENT 4 (PAD4) et SENESCENCE-ASSOCIATED GENE 101 (SAG101) qui interagissent ensemble (Feys *et al.* 2001, Feys *et al.* 2005), sont impliquées dans la transduction du signal qui va conduire à l'accumulation de SA en réponse à des pathogènes (Wiermer *et al.* 2005). La perception des agents pathogènes par des récepteurs de type TIR-NBS-LRR (« Toll-Interleukin-1 Receptor-Nucleotide Binding Site-Leucine Rich Repeat ») et l'accumulation d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) sont autant de signaux qui activent les protéines EDS1 et PAD4, induisant ensuite l'accumulation de SA (Wiermer *et al.* 2005).

La perception du SA libre par les cellules se fait par le trio de protéines NON EXPRESSOR OF PATHOGENESIS RELATED GENES 1, 3 et 3 (NPR1, 3 et 4), toutes trois capables de lier le SA (Fu *et al.* 2012, Wu *et al.* 2012). De nombreux modèles sont proposés pour expliquer la fonction de chaque protéine NPR dans la voie de signalisation du SA, et il semble qu'en fonction du type de résistance mis en jeu, PTI, ETI ou encore SAR, et de la concentration cellulaire en SA, les mécanismes de régulation seront différents (Pajerowska-Mukhtar *et al.* 2013). Il est cependant admis que la protéine NPR1 serait l'effecteur central modulant l'expression de gènes de réponse au SA via son interaction avec des facteurs de transcription de type TGA<sup>1</sup> et WRKY<sup>2</sup>. En absence de SA, les monomères de NPR1 sont regroupés pour former des oligomères dans le cytoplasme incapables de rentrer dans le noyau pour réguler l'expression des gènes (Figure 35). De plus, les quelques monomères de NPR1 qui pourraient rentrer dans le noyau en absence de SA interagissent avec NPR4 qui induit alors la polyubiquitination de NPR1 et son adressage au protéasome (Fu *et al.* 2012). Lors de l'accumulation de SA en cas de perception d'un pathogène, la phytohormone va à la fois provoquer un changement de l'état redox du cytoplasme et se lier directement à NPR1, ce qui libérerait des monomères de NPR1 qui sont transloqués dans le noyau (Pajerowska-Mukhtar *et al.* 2013). Le SA pourrait se lier à NPR4 dans le noyau, l'empêchant d'interagir avec NPR1 (Figure 35), notamment dans des cellules présentant une concentration moyenne en SA, par exemple lors de la SAR. De plus, en cas de forte accumulation de SA au niveau des cellules directement en contact avec le pathogène, la liaison de la protéine NPR3 à la phytohormone induit son interaction avec NPR1, ce qui la polyubiquitine et l'adresse ainsi au

<sup>1</sup> Les facteurs de transcription TGA se fixent à la séquence d'ADN TGACG, d'où leur nom.

<sup>2</sup> Le nom provient de la séquence d'acides aminés conservée présente chez ces facteurs de transcription : WRKYGQK.





protéasome (Figure 35) (Fu *et al.* 2012). Ces interactions entre NPR1 et NPR3, ou NPR1 et NPR4, permettraient ainsi de contrôler finement les réponses de défenses.

L'accumulation et la perception du SA sont cruciales dans la résistance des plantes face aux pathogènes biotrophes et hémibiotrophes et dans le développement de la HR. En effet, le mutant *sid2* présente une diminution de la résistance et un retard de l'apparition de la HR après une infection avec des souches avirulentes de *Peronospora parasitica* (pathogène biotrophe) et *Pseudomonas syringae* (pathogène hémibiotrophe) (Nawrath and Metraux 1999). Ces données sont étayées par l'analyse de lignées exprimant le transgène bactérien *NahG* qui code une salicylate hydroxylase, dégradant le SA en catéchol (Friedrich *et al.* 1995). Ces lignées, qui accumulent très peu de SA, présentent une diminution de la résistance à *P. parasitica* et *P. syringae* (Nawrath and Metraux 1999). Les mutants *eds1* et *pad4* sont également affectés dans la résistance à de nombreux pathogènes biotrophes et hémibiotrophes (Parker *et al.* 1996, Zhou *et al.* 1998).

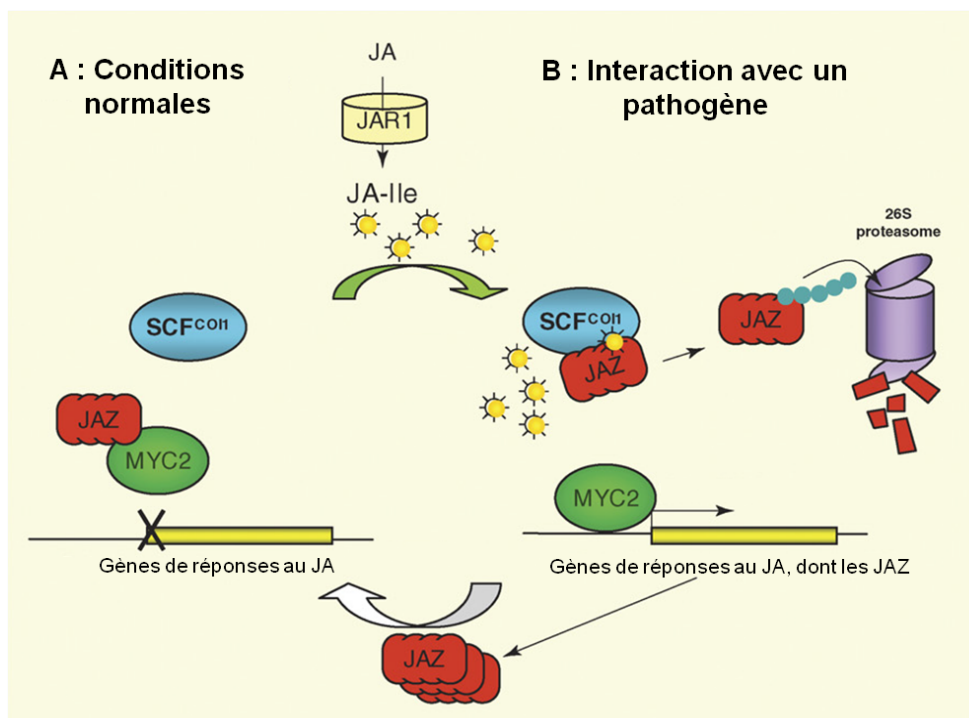
Le SA semble également être une hormone essentielle à l'apparition des lésions chez de nombreux LMMs. En effet, la suppression de l'accumulation ou de la signalisation du SA, dans un contexte génétique *sid2*, *eds1* et *npr1* ou dans des lignées exprimant *NahG*, inhibent l'apparition des lésions spontanées chez de nombreux LMM (Lorrain *et al.* 2003).

De plus, le SA joue un rôle majeur dans la mise en place de la SAR puisque le signal mobile activant la résistance dans les autres parties de la plante pourrait être le MeSA (Park *et al.* 2007) et que NPR1 promeut l'induction de l'expression de gènes de défenses, tels que les gènes *PR* (Mou *et al.* 2003).

*Le SA joue donc un rôle important dans la résistance aux agents pathogènes, notamment grâce l'induction de MCP. Cependant, la signalisation SA n'est pas la seule à être impliquée dans le contrôle de la HR, les voies de transduction du JA et de l'ETH sont également importantes.*

### 2.2.2. L'acide jasmonique

Le JA est une hormone de type lipidique issue de la voie des oxilipines. Dans un premier temps, des lipases libèrent l'acide linoléique, un acide gras en C18, depuis les membranes cellulaires (Wasternack and Hause 2013). Ce composé est ensuite transformé en cyclopentones dans le chloroplaste, qui seront réduits puis oxydés dans le péroxysome, formant ainsi du JA. Ce n'est que dans le cytoplasme que le JA est converti en ses formes actives : le méthyl jasmonate (MeJA) est produit par les enzymes JMT (« Jasmonate Methyl Transferase »), et le JA-Isoleucine



**Figure 36. Représentation simplifiée de l'activation de gènes de défense en réponse au JA (modifié d'après Chico *et al.* 2008).**

Dans des conditions normales (A), l'activité de MYC2 est réprimée par son interaction directe avec les protéines JAZ. Au cours d'une interaction avec un pathogène (B), le JA-Ile, synthétisé par JAR1, se lie à COI1, au sein du complexe SCF<sup>COI1</sup> qui induit la polyubiquitination des protéines JAZ et ainsi leur dégradation par le protéasome 26S. Le facteur de transcription MYC2 peut ensuite activer l'expression des gènes de réponse au JA, incluant les gènes JAZ. Les nouvelles protéines JAZ ainsi synthétisées restaurent la répression de MYC2, créant un rétrocontrôle négatif.

COI1 : « Coronatine Insensitive 1 » ; JA-Ile : « JA-Isoleucine » ; JAR1 : « Jasmonate Resistant 1 » ; JAZ : (« JA-Zim domain protein »)

(JA-Ile) produit par JAR1 (« Jasmonate Resistant 1 »). Le MeJA est une molécule volatile et permet la communication de plantes à plantes lors d'attaque par des pathogènes.

Le JA-Ile est perçu dans la cellule par la protéine CORONATINE INSENSITIVE 1 (COI1) (Yan *et al.* 2009), qui interagit avec d'autres protéines pour former un complexe ubiquitine ligase nommé SCF<sup>COI1</sup> (pour « E3 ubiquitin ligase SKP1-cullinFbox complex»). Une fois lié au JA-Ile, le complexe SCF<sup>COI1</sup> interagit avec les protéines JAZ (« JA-Zim domain protein ») les adressant ainsi au protéasome 26S (Staswick 2008). Les protéines JAZ étant des répresseurs du facteur de transcription MYC2, leur dégradation lève la répression de MYC2 qui active ensuite des défenses dépendantes du JA (Figure 36).

Le JA est une phytohormone généralement impliquée dans la résistance aux insectes herbivores et aux pathogènes nécrotrophes (Wasternack and Hause 2013). Par exemple, le mutant *jar1* est plus sensible aux pathogènes nécrotrophes comme *Pythium irregulare* et *Botrytis cinerea* (Staswick *et al.* 1998).

Les voies du SA et du JA sont antagonistes, des facteurs agissant positivement dans une voie ayant un effet négatif sur l'autre voie (Pieterse *et al.* 2012). Ainsi, alors que la protéine MAP KINASE 4 (MPK4) est indispensable à l'expression de marqueurs associés à la voie du JA, elle inhibe la signalisation SA. En effet, le mutant *mpk4* exprime constitutivement des gènes de réponse au SA et présente une forte accumulation de cette phytohormone (Petersen *et al.* 2000). De plus, le récepteur du SA, NPR1, ou le facteur de transcription WRKY70, induit par la voie SA, sont deux autres facteurs agissant positivement sur l'expression des gènes de défense régulés par le SA mais négativement sur ceux régulés par le JA (Li *et al.* 2004, Spoel *et al.* 2007). A l'inverse, le facteur de transcription MYC2 est un répresseur de la voie du SA (Pieterse *et al.* 2009).

*Le JA est une phytohormone souvent associée à la défense des plantes vis-à-vis d'agents pathogènes nécrotrophes. Sa voie de signalisation connectée à celle du SA est antagoniste à celle-ci. De ce fait, le JA agirait plutôt négativement sur la mise en place de la HR. Cependant des régulations croisées positives entre le SA et le JA ont également été identifiées et seraient dépendantes de la spécificité de l'agent pathogène (Pieterse et al.2012).*

### 2.2.3. L'éthylène

L'ETH est un gaz connu pour réguler des processus développementaux multiples comme la maturation des fruits, l'abscission ou encore la sénescence des fleurs et des feuilles. L'ETH est formé à partir de la méthionine qui est transformée en 1-AminoCyclopropane-1-Carboxylic-acid



(ACC) par une ACC synthase, puis oxydé par une ACC oxydase pour donner de l'ETH (Lyzenga and Stone 2012). Plusieurs récepteurs de l'ETH ont été décrits tels que ETHYLENE RESPONSE 1 et 2, ETHYLENE INSENSITIVE 4, ETHYLENE RESPONSE SENSOR 1 et 2 (ETR1, ETR2, EIN4, ERS1, et ERS2) (Merchante *et al.* 2013). Tous sont des protéines transmembranaires qui possèdent dans leur partie C-terminale un domaine d'interaction avec le régulateur négatif CONSTITUTIVE TRIPLE RESPONSE 1 (CTR1). En absence d'éthylène, la protéine CTR1 est activée par les récepteurs et induit, via EIN2, la dégradation du facteur de transcription EIN3 par le protéasome. En présence d'éthylène, les récepteurs n'activent plus CTR1, ce qui bloque la dégradation d'EIN3 qui s'accumule dans la cellule et induit l'expression d'autres facteurs de transcription tel que le facteur ETHYLENE RESPONSE FACTOR 1 (ERF1) (Merchante *et al.* 2013). Par la suite, ERF1 permet d'activer l'expression de gènes de défense comme *PLANT DEFENSIN 1.2* (*PDF1.2*).

Le rôle de l'éthylène dans les mécanismes de défense n'est pas toujours très clair. En effet, des mutants de signalisation ou de perception de l'ETH ne répondent pas de la même manière à un même agent pathogène et des résultats contradictoires peuvent être trouvés dans la littérature (van Loon *et al.* 2006a). L'ETH peut également agir en synergie avec le JA pour activer l'expression de gènes de défenses en réponse à des pathogènes (Glazebrook 2005). Par exemple, les gènes *EIN2* ou *JAR1* sont nécessaires pour activer l'expression de *PDF1.2* (Penninckx *et al.* 1998). Tout comme le JA, l'ETH a également un impact négatif sur la voie de signalisation du SA. Les protéines EIN3 et ETHYLENE INSENSITIVE 3-LIKE 1 (EIL1) répriment l'expression du gène *ICS1* (Chen *et al.* 2009).

Au cours de la HR, il est observé une forte production d'ETH, cependant son rôle dans la stimulation ou au contraire l'inhibition de la formation des lésions est débattu (van Loon, Geraats and Linthorst 2006a). L'analyse de certains LMMs montre également que le développement des lésions est accompagné de la production d'ETH, et de l'expression du gène *PDF1.2* (Devadas *et al.* 2002, Pilloff *et al.* 2002).

*La voie de transduction de l'ETH, avec celles du SA et du JA, constituent des mécanismes de régulation s'influençant les uns les autres, ce qui permet de contrôler étroitement des réponses ciblées et efficaces pour faire face aux agents pathogènes. Dans le cas de certaines interactions, comme celles avec des pathogènes avirulents, le SA semble avoir un rôle prépondérant.*



### 2.3. Les conséquences de l'activation de la HR

Les voies de signalisation évoquées précédemment aboutissent toutes au noyau et à la modulation de l'expression de nombreux gènes. Ces gènes codent des protéines, appelées protéines de défenses car elles sont synthétisées au cours d'une interaction plante-pathogène ou par un éliciteur de réactions de défense (van Loon *et al.* 2006b). De plus, les gènes induits au cours de la mise en place des réactions de défense comme la HR, également nommés « gènes marqueurs de défense », sont utilisés comme des outils permettant de caractériser et/ou de quantifier la mise en place de ce processus.

Les premières protéines, qui ont été qualifiées de protéines de défense, sont les protéines PR (« Pathogenesis Related ») (van Loon *et al.* 2006b). Elles ont dans un premier temps été identifiées comme étant induites dans des feuilles de tabac suite à l'infection par le virus de la mosaïque du tabac (Antoniw *et al.* 1980). Les protéines PR sont maintenant caractérisées dans la plupart des plantes étudiées (van Loon *et al.* 2006b), et sont classées en 17 familles en fonction de leur activité : anti-fongique (PR1), chitinase (PR3, PR4 et PR11), glucanase (PR2), protéase (PR7), inhibiteur de protéase (PR6), production de ROS (PR15 et PR16), détoxification des ROS (PR9) et autres... L'accumulation de certaines de ces protéines dépend des voies hormonales concernées. Par exemple, la production des protéines PR1, PR2 et PR5 dépend du SA tandis que celle de PR12 dépend du JA. Les protéines PR3 et PR4 sont induites par la voie de l'ETH et PR13 dépend des deux voies JA et ETH (van Loon *et al.* 2006b).

Les protéines produites en cas d'attaques pathogènes peuvent également être des enzymes impliquées dans la biosynthèse de composés de faible poids moléculaire. Les phytoalexines font partie de ces composés induits après la détection d'un agent pathogène (Ahuja *et al.* 2012). Ces molécules présentent des propriétés antimicrobiennes permettant de lutter contre de nombreux pathogènes. De natures variées, elles sont spécifiques de l'espèce végétale considérée, indépendamment de l'agent pathogène inducteur. La camalexine est une phytoalexine majeure chez *Arabidopsis* (Bednarek 2012). Le précurseur de ce composé est le tryptophane, qui subit plusieurs étapes de conversion catalysées par des protéines de la famille des cytochromes P450. La dernière étape de la biosynthèse de la camalexine est réalisée par le cytochrome CYP71B15, nommé PAD3 (« PhytoAlexine Deficient 3 ») chez *Arabidopsis* (Ahuja *et al.* 2012).

La scopolétine est une autre phytoalexine (Ahuja *et al.* 2012). Identifiée chez le tabac et *Arabidopsis*, elle s'accumule au cours de la HR (Costet *et al.* 2002, Simon *et al.* 2010), et plus particulièrement dans une zone appelée « Localized Acquired Resistance » (LAR). La LAR



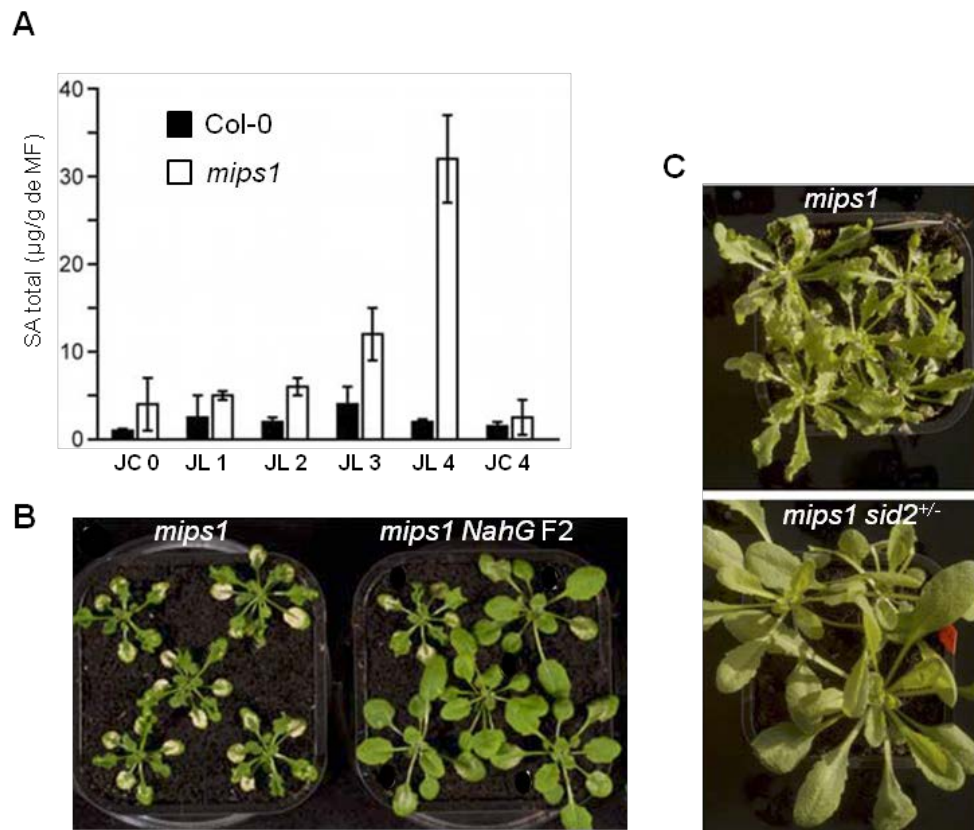


représente une fine couche de cellules manifestant de fortes réponses de défense et entourant les cellules mortes lors de la HR. La scopolétine, qui possède des propriétés antioxydantes, pourrait servir à limiter la propagation de la MCP (Costet *et al.* 2002).

De nombreuses protéines induites lors des réponses de défense sont des régulateurs, comme les facteurs de transcription WRKY. Les gènes codant ces protéines constituent une importante famille multigénique impliquée dans la régulation des réponses des plantes face aux stress biotiques et abiotiques, et également dans des processus développementaux (Rushton *et al.* 2010). Au cours des interactions plantes-pathogènes, les facteurs de transcription WRKY jouent des rôles dans la PTI, l'ETI et la SAR en tant que régulateurs négatifs ou positifs. Par exemple, chez *Arabidopsis*, les protéines WRY18 et WRKY40 réguleraient négativement les réponses de défense. En effet, elles seraient des inhibiteurs de l'expression des gènes *EDS1* et *PAD4*, acteurs positifs de la voie du SA, et des activateurs de l'expression de *JAZ8*, acteur négatif de la voie du JA (Pandey *et al.* 2010). Au contraire, les protéines WRKY70 et WRKY33 sont des facteurs de transcription activant les réponses de défense. WRKY33 forme un complexe avec MPK4 et MAPK Substrate 1 (MKS1), qui se dissocie en cas d'attaque pathogène. Une fois libre, WRKY33 peut activer l'expression du gène *PAD3* (Qiu *et al.* 2008).

De nombreuses autres protéines sont induites lors de la HR : des protéines de détoxification des ROS (peroxydases, catalases, superoxyde dismutases...), des protéines du métabolisme secondaire permettant la synthèse de lignines, des protéines du métabolisme et du transport des lipides, etc (van Loon *et al.* 2006b). Tout cela constitue *in fine* une armada pour faire face aux attaques biotiques.

*La MCP, dont la HR fait partie, est régulée par des phytohormones ainsi que par de nombreux autres régulateurs protéiques et moléculaires tels que les ROS. Ma thèse s'inscrit dans ce contexte scientifique à travers l'exploitation et la caractérisation du LMM mips1.*



**Figure 37. Le développement des lésions chez *mips1* est dépendant de l'accumulation de SA (modifié d'après Meng *et al.* 2009).**

Lors du début de l'apparition des lésions, 4 jours après transfert en JL, une forte accumulation de SA est observée chez le mutant *mips1* (A). Le mutant *mips1* a été croisé avec une lignée surexprimant le transgène *NahG*, qui code une enzyme qui dégrade le SA en catéchol. La descendance F2 en ségrégation issue de ce croisement présente des plantes homozygotes pour l'allèle muté *mips1* sans lésion (B), suggérant que l'accumulation de SA est nécessaire à l'apparition des lésions. Pour confirmer cela, *mips1* a été croisé avec le mutant *sid2* affecté dans la biosynthèse de SA. Des plantes sesquimutantes *mips1 sid2<sup>+/-</sup>* ne présentent plus de lésions (C).

JC : condition Jour-Court ; JL : condition Jour-Long ; JL 1, 2 ,3 ,4 : 1, 2, 3 et 4 jours après transfert en JL ; MF : Masse fraîche.

### III. Problématique et objectifs de la thèse

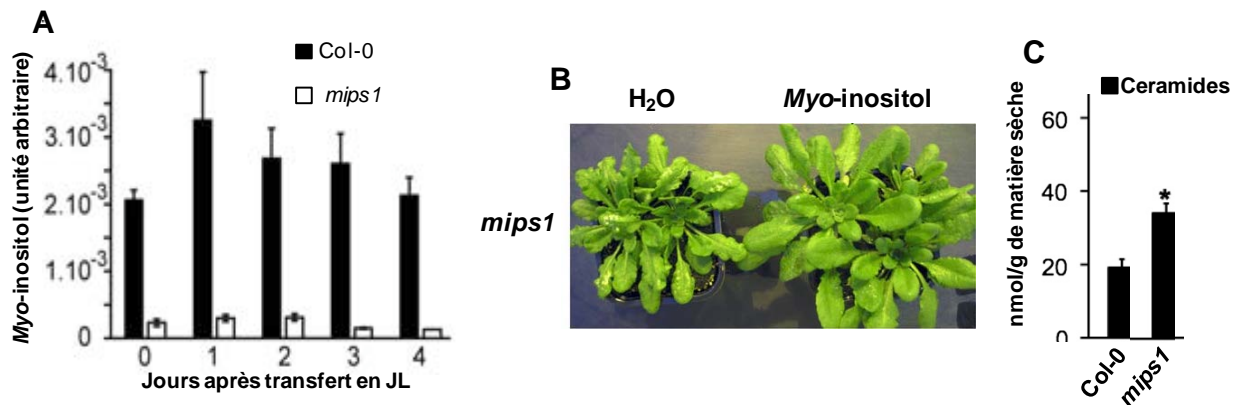
Afin de mieux comprendre le rôle des protéines ARABIDOPSIS THRIORAX RELATED 5 et 6 (ATXR5 et 6), codant deux Histone Méthyl-Transférases (HMT), dans le contrôle du cycle cellulaire, le laboratoire d'accueil avait réalisé, il y a plusieurs années, un crible double hybride en utilisant ATXR5 comme appât. Cette approche a permis d'identifier un partenaire inattendu de ces deux HMT : la protéine MIPS1 (Meng *et al.* 2009), ce qui a conduit le laboratoire à travailler sur cette enzyme du métabolisme primaire.

#### 1. Problématique : le LMM *mips1*

L'analyse du mutant *mips1* d'Arabidopsis a révélé que celui-ci développe spontanément des lésions sur ses feuilles de rosette en conditions de JL, dues à une induction de MCP (§I.5.3) le classant dans la catégorie des LMM.

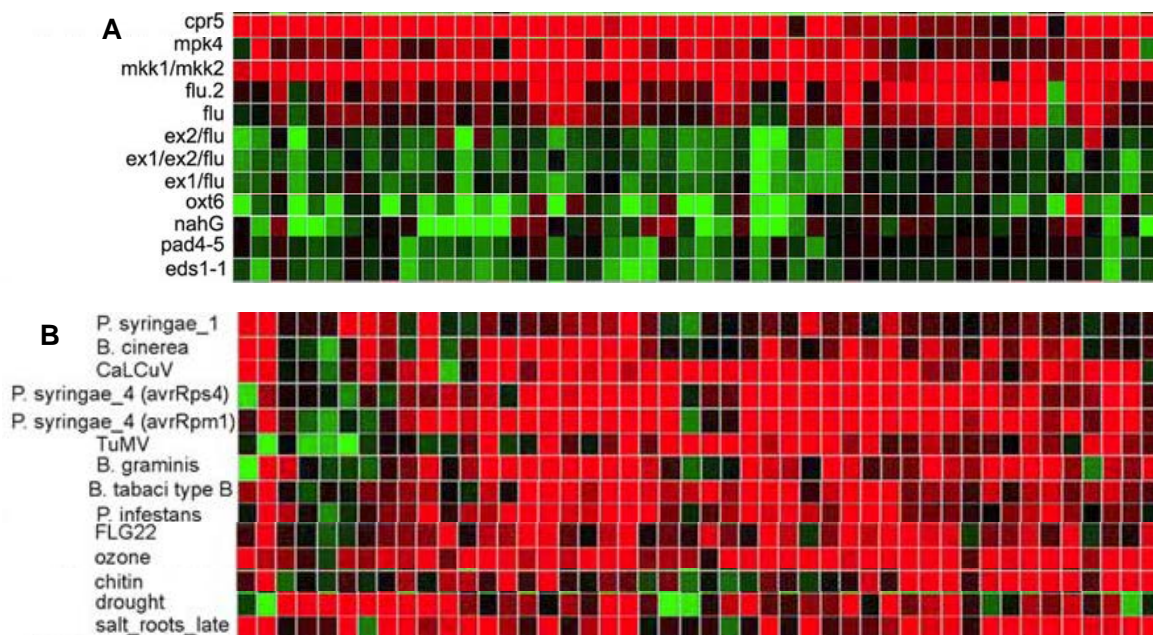
Des analyses complémentaires ont permis de mettre en évidence le rôle majeur du SA dans l'apparition des lésions chez *mips1*. En effet, le développement des lésions après quatre jours en JL est corrélé à une accumulation de SA (Figure 37A) et le double mutant *mips1 sid2* ou bien le mutant *mips1* exprimant le gène *NahG* par transgénèse, se caractérisent par une abolition de l'apparition des lésions (Figure 37B et C) (Meng *et al.* 2009). Les voies du JA sont antagonistes à celles du SA dans le contrôle de la MCP (§II.2.2.2.). Pour tester l'effet d'une diminution de la synthèse du JA sur les lésions, le mutant *mips1* a également été croisé avec le mutant *aos* (*allene oxide synthase*) désactivé dans un gène de biosynthèse de la phytohormone (Park *et al.* 2002). Le double mutant *mips1 aos* présente également des lésions indiquant que ce phénotype est indépendant de l'action du JA (Meng *et al.* 2009).

L'enzyme MIPS1 est responsable de la biosynthèse de la majeure partie du MI accumulé dans les feuilles, le mutant *mips1* présentant une diminution drastique de ce composé (Figure 38A). L'apparition des lésions chez *mips1* pourrait donc être due à cette diminution de la teneur en MI, mais il ne peut être exclu que la protéine MIPS1 possède une autre fonction que sa fonction catalytique, et qui soit liée à la régulation de l'apparition de la MCP. Dans le cadre de cette hypothèse, des tests consistant à asperger avec du MI le mutant *mips1* après transfert en JL ont été réalisés. Cette opération permet supprimer totalement l'apparition des lésions, confirmant



**Figure 38. Un défaut de biosynthèse du *myo*-inositol est responsable de l'apparition des lésions chez *mips1* (modifié d'après Donahue *et al.* 2010, Meng *et al.* 2009).**

Que ce soit en JC ou en JL, le mutant *mips1* présente une forte diminution de la teneur en MI dans les feuilles de rosettes, comparée au sauvage (A). Le fait d'apporter une source extérieure de MI, en aspergeant les feuilles de rosettes, permet de supprimer les lésions (B). Le MI peut se lier aux céramides pour former des inositolphosphorylcéramides. La diminution de la teneur en MI semble être responsable d'une accumulation de céramides et d'hydroxycéramides (C) (les chaînes d'acides gras sont hydroxylées), souvent responsable de l'induction de mort cellulaire.



**Figure 39. Expression des gènes les plus induits chez *mips1* dans d'autres mutants et en réponse à des stimuli (modifié d'après Meng *et al.* 2009).**

Le niveau relatif d'expression des gènes les plus surexprimés chez *mips1* a été analysé chez d'autres LMM ou supprimeurs de LMM (A) ou en réponse à des stress biotiques et abiotiques (B). Pour cela, le logiciel en ligne Genevestigator, compilant des données transcriptomiques publiques, a été utilisé.

qu'une diminution de la teneur en MI suffit à induire la MCP sur les feuilles (Figure 38B) (Meng *et al.* 2009)

Le MI est à l'origine de plusieurs dérivés impliqués dans de nombreuses fonctions cellulaires au sein de la plante. Parmi ces dérivés, le PtdIns est utilisé comme donneur d'inositol pour être lié à la tête des céramides et former des inositolphosphorylceramides (§I.2.1). Les céramides font partie de la famille des sphingolipides dont l'accumulation dans la cellule est un signal positif induisant la MCP (§II.2.1). Le dosage de ces composés dans le mutant *mips1* montre une diminution de la teneur en PtdIns et à l'inverse, une accumulation en céramides (Figure 38C) (Donahue *et al.* 2010), ce qui laisse supposer que l'induction de la MCP chez *mips1* pourrait être due à cette accumulation. Cependant, le MI étant impliqué dans la synthèse de nombreux autres dérivés, il n'est pas exclu que ce soit l'altération de la teneur de certains des autres dérivés qui soit responsable des lésions.

Afin de mieux comprendre les processus moléculaires impliqués dans la mort cellulaire du mutant *mips1*, l'équipe a analysé le transcriptome de *mips1* en JC et en JL quatre jours après transfert en utilisant des puces CATMA v2 (« Complete Arabidopsis Transcriptome MicroArray ») (Crowe *et al.* 2003). Le type sauvage Col-0 cultivé dans les mêmes conditions a été utilisé comme témoin. En condition de JC, le mutant *mips1* ne présente que 271 gènes différentiellement exprimés alors que quatre jours après transfert en JL, 1856 gènes sont soit surexprimés (1032), soit sous exprimés (824) (Meng *et al.* 2009). Parmi les gènes surexprimés en JL, nombreux sont des gènes marqueurs des réponses de défenses, comme les gènes *PR5*, *EDS1* et *PAD4*. Quant aux gènes sous exprimés, un grand nombre d'entre eux codent des protéines impliquées dans des fonctions chloroplastiques, conséquence probable de l'induction de la MCP, durant laquelle ces fonctions sont altérées et les chloroplastes dégradés.

Le transcriptome de *mips1* a également été comparé aux données de transcriptomiques publiques obtenues à partir de plantes sauvages traitées par divers stimuli ou à partir de mutants, disponibles sur Genevestigator (Zimmermann *et al.* 2004). Les comparaisons, effectuées avec les 150 gènes les plus surexprimés dans *mips1* en JL, ont montré que ces gènes sont également surexprimés chez d'autres LMMs, tels que *cpr5*, *mpk4* ou *flu* (Figure 39A) (Meng *et al.* 2009). De plus, ces gènes sont induits lors de nombreux stress abiotiques (sécheresse, sel, ozone, ...) et lors d'interactions avec des pathogènes (Figure 39B). Au contraire, chez des mutants affectés pour des acteurs positifs de la mort cellulaire, ces mêmes gènes sont sous exprimés. C'est le cas des mutants *eds1* et *pad4*, ou du triple mutant *ex1 ex2 flu*, qui supprime la mort cellulaire du mutant *flu* (§II.2.1.).



*L'analyse transcriptomique a permis de montrer que de nombreux gènes marqueurs des réponses de défenses ou de réponses aux stress abiotiques, sont surexprimés lors de l'apparition des lésions chez le mutant *mips1**

*Cependant, ces analyses ne reflètent que les conséquences de l'apparition des lésions de type HR, et ne permettent pas d'identifier les facteurs responsables de l'induction de la MCP. De plus, mis à part le fait que les lésions soient dues à une diminution drastique de la teneur en MI et que le SA est indispensable à leur développement, peu de choses étaient comprises sur leur origine. D'autres analyses s'avéraient donc nécessaires afin d'élucider les mécanismes mis en jeu lors du développement de la MCP chez *mips1*.*

## 2. Objectifs de la thèse

Dans le but d'identifier des facteurs impliqués dans la MCP induite chez *mips1*, le laboratoire décida d'utiliser en parallèle deux approches génétiques distinctes :

- La première approche est une analyse de relations d'épistasies entre le mutant *mips1* et d'autres mutants, par génétique indirecte. Pour cela, le mutant *mips1* a été croisé avec des mutants préalablement connus pour leur implication dans la MCP chez *Arabidopsis*, notamment ceux présentant des transcriptomes corrélés ou inversement corrélés à celui de *mips1*. L'obtention de doubles mutants accentuant ou supprimant les lésions devrait permettre d'identifier des facteurs agissant négativement ou positivement dans le processus de MCP induit chez *mips1*.

**L'un des objectifs** de ma thèse a été de caractériser le double mutant *mips1 oxt6* obtenu par cette approche gène candidat afin de comprendre le rôle de la protéine désactivée par la mutation *oxl6* dans la MCP. Cette partie de mon travail a été publiée dans la revue « Plant Physiology » et fait l'objet de la première partie des résultats.

- La seconde approche du laboratoire a consisté à réaliser un crible génétique afin d'identifier des supprimeurs du mutant *mips1*, comme cela a déjà été fait pour d'autres LMMSs (§II.2.1). Cette approche de génétique directe, sans *a priori*, avait pour objectif d'identifier des nouveaux facteurs, acteurs positifs de la mise en place des lésions chez *mips1*, et plus généralement dans la MCP. Pour cela, les graines du mutant *mips1* ont été mutagénisées à l'EMS (« Ethyl Methane Sulphonate »), un agent mutagène chimique



Suppresseurs	Ploïdie	Dominance/Récessivité
<i>somi1</i>	Diploïde	Récessif
<i>somi2</i>	Diploïde	Récessif
<i>somi3</i>	Diploïde	Récessif
<i>somi4</i>	Tétraploïde	?
<i>somi5</i>	Diploïde	Récessif
<i>somi6</i>	Aneuploïde	Semi-dominant
<i>somi7</i>	Tétraploïde	?
<i>somi8</i>	Tétraploïde	Récessif
<i>somi9</i>	Diploïde	Dominant
<i>somi10</i>	?	Dominant

**Tableau 2. Liste de supresseurs identifiés par mutagenèse du mutant *mips1*.**

convertissant les bases guanines en adénines. Les doubles mutants ainsi obtenus ont ensuite été sélectionnés uniquement pour leur capacité à supprimer les lésions en JL. Ces mutants ont été baptisés *somi* pour « suppressors of *mips1* ». Les supresseurs identifiés en première génération M1 sont dominants alors que ceux identifiés en seconde génération M2 sont récessifs. Certains d'entre eux sont listés dans le Tableau 2 qui précise leur déterminisme génétique et leur niveau de ploïdie.

**L'autre objectif** de ma thèse a donc été de caractériser trois de ces supresseurs obtenus par l'approche de génétique directe avant le début de ma thèse. Le choix s'est porté sur les supresseurs *somi1*, *somi2* et *somi3*. Ces supresseurs étant diploïdes et les mutations récessives, l'analyse génétique en était facilitée. Mon travail a consisté à caractériser phénotypiquement ces mutants, à cartographier et à identifier la mutation responsable de la suppression des lésions dans chaque supresseur, et à comprendre les mécanismes à l'origine de cette suppression. Les analyses de ces trois supresseurs constituent les trois autres parties des résultats.



# RESULTATS



# I. Rôle de la protéine CPSF30 dans la MCP chez Arabidopsis

## 1. Introduction

Lorsque le laboratoire a initié une stratégie « gène candidat » pour rechercher des effecteurs de la mort cellulaire dépendante du MI, le mutant *mips1* a été croisé avec de nombreuses lignées mutantes choisies soit parce qu'elles présentaient un transcriptome similaire ou inverse de celui de *mips1*, soit parce que le gène muté avait des fonctions connues dans le développement de lésions spontanées. Alors qu'aucune suppression de phénotype n'a été observée avec certains mutants qui avaient été privilégiés dans cette démarche, tels que *executer1* et 2 (*ex1* et 2), un des doubles mutants obtenus présenta une suppression totale de l'apparition des lésions : *mips1 oxt6* (pour *oxidative stress tolerant 6*), *oxt6* possédant un transcriptome inverse de celui de *mips1* (Figure 40) (Meng *et al.* 2009). Cette observation était particulièrement intéressante bien qu'aucun lien entre la mutation *oxt6* et la MCP ou l'immunité n'ait été préalablement décrit. En effet, il s'agit d'un mutant obtenu par insertion d'un ADN-T dans le gène *CLEAVAGE AND POLYADENYLATION SPECIFICITY FACTOR 30 (CPSF30)*, codant une sous-unité du complexe CPSF impliqué dans la polyadénylation des ARNm. Le rôle de la maturation des ARNm au cours de la MCP et l'immunité chez les plantes est à l'heure actuelle peu connu, mais de plus en plus d'études montrent que le fonctionnement correct de ces processus s'avère crucial dans les réponses immunitaires.

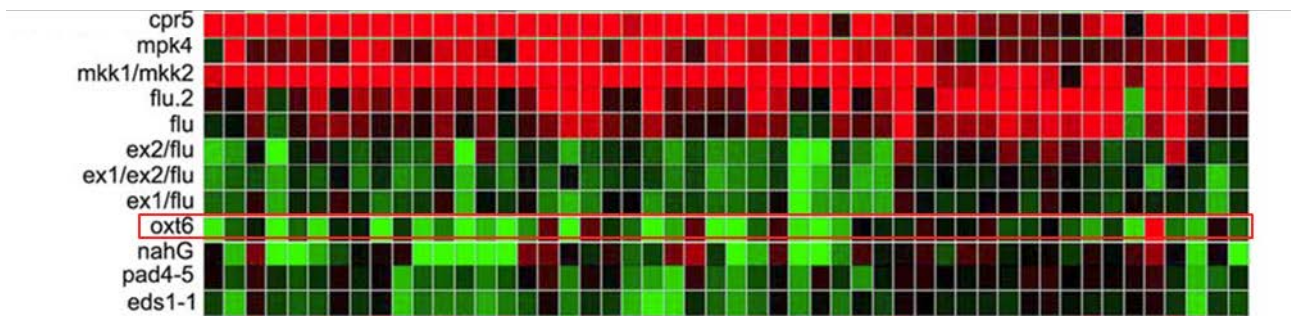
Lors de mon arrivée au laboratoire, la caractérisation génétique, physiologique et moléculaire de l'interaction fonctionnelle entre MIPS1 et CPSF30 m'a été confiée.

## 2. Résultats

La grande majorité des résultats que j'ai obtenus sur cette thématique ont fait l'objet de l'article présenté ci-après<sup>1</sup>.

---

<sup>1</sup> Pour information, les figures supplémentaires sont placées en vis-à-vis du texte, sauf le tableau S1 situé en Annexe1.



**Figure 40.** Le mutant *oxt6* présente un profil transcriptomique inversé, comparé à celui de *mips1* (modifié d'après Meng et al. 2009).

Le logiciel en ligne Genevestigator, compilant des données transcriptomiques publiques, a été utilisé.

**Article 2 : “The Polyadenylation Factor Subunit CLEAVAGE AND POLYADENYLATION SPECIFICITY FACTOR30: A Key Factor of Programmed Cell Death and a Regulator of Immunity in Arabidopsis”**

**Auteurs** : Quentin Bruggeman, Marie Garmier, Linda de Bont, Ludivine Soubigou-Taconnat, Christelle Mazubert, Moussa Benhamed, Cécile Raynaud, Catherine Bergounioux, and Marianne Delarue.

**Journal** : *Plant Physiology*, 2014, Volume 165, pages 732-746.

**Résumé en français**

La Mort Cellulaire Programmée (MCP) est essentielle pour différents aspects de la vie des plantes, dont le développement et les réponses aux stress. En effet, les interactions incompatibles plantes-pathogènes sont bien connues pour induire la réponse hypersensible, une mort cellulaire localisée. Des approches génétiques ont permis d'identifier plusieurs composants clés de la MCP, et nous avons récemment caractérisé le mutant *mips1* d'*Arabidopsis thaliana*, désactivé pour une enzyme clé catalysant l'étape limitante de la biosynthèse du *myo*-inositol. L'une des caractéristiques les plus frappantes de *mips1* est la formation de lésions sur les feuilles. Celles-ci sont dépendantes de la lumière et de l'accumulation d'acide salicylique (SA) qui induit massivement la MCP. Ceci souligne l'importance du *myo*-inositol et de ses dérivés dans la régulation de la MCP. Dans ce travail, nous avons identifié un régulateur de la MCP grâce au crible de mutants présentant des profils transcriptomiques opposés à celui du mutant *mips1*. Il s'agit du mutant *oxl6*, possédant un ADN de transfert inséré dans le gène *CLEAVAGE AND POLYADENYLATION SPECIFICITY FACTOR30* (*CPSF30*), codant une sous-unité d'un complexe impliqué dans la polyadénylation. Nous démontrons que *CPSF30* est requis pour la formation des lésions chez *mips1* via une signalisation dépendante du SA, que son action positive dans l'apparition de la mort n'est pas médiée par un changement du statut du glutathion, et que l'activité de *CPSF30* est requise dans la résistance à *Pseudomonas syringae*. Nous démontrons également que la mutation *oxl6* supprime la mort cellulaire d'autres « lesion mimic mutants », tels que *lesion-simulating disease 1* (*lsd1*), *mitogen-activated protein kinase 4* (*mpk4*), *constitutive expressor of pathogenesis-related genes 5* (*cpr5*) et *catalase 2* (*cat2*), suggérant que *CPSF30*, et donc le contrôle de la polyadénylation des ARN, à travers la régulation de la production de SA, est un processus clé des réponses immunes des plantes.



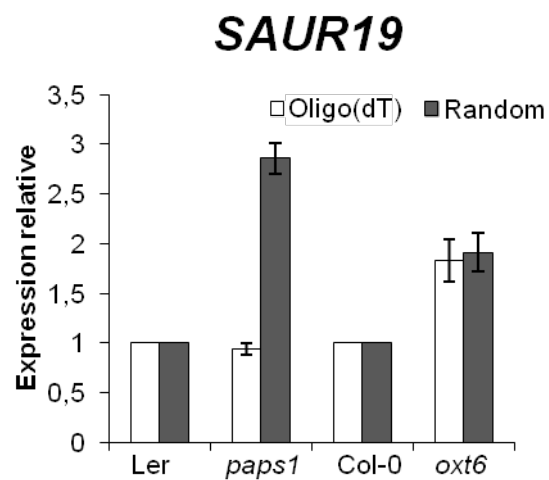


### 3. Discussion et perspectives complémentaires

Dans l'étude présentée ci-dessus, nous avons montré que CPSF30 est un facteur de polyadénylation nécessaire pour l'induction de la mort cellulaire et des réponses immunes dépendantes de la voie du SA. En effet, la mutation *oxl6* supprime les phénotypes dépendants du SA de plusieurs LMMs et est nécessaire à la résistance face à *P. syringae*, également dépendante de la voie SA. Cependant, il est possible que l'action de CPSF30 ne soit pas cantonnée à la voie du SA, et que ce facteur intervienne également dans les voies du JA ou bien de l'ETH. Pour tester cette hypothèse, il sera possible d'effectuer des tests de résistances du mutant *oxl6* face à des pathogènes nécrotrophes, comme *Botrytis cinerea*, car les voies du JA et de l'ETH sont plus particulièrement impliquées dans la résistance face à ce type de pathogènes (Pieterse *et al.* 2009). Il serait également intéressant de croiser le mutant *oxl6* avec des LMMs dont le phénotype ne dépend pas totalement de la voie du SA, tels que les mutants *hrl1*, *camta3/sr1*, *edr1* ou encore *vad1* (§Introduction. I.2.1) (Bouchez *et al.* 2007, Devadas, Enyedi and Raina 2002, Nie *et al.* 2012, Tang *et al.* 2005).

Nous avons également démontré que CPSF30 est nécessaire à l'induction et même au maintien à un niveau normal de l'expression de nombreux gènes impliqués dans la MCP, l'immunité ou encore la réponse aux stress abiotiques. Cette protéine, qui agit dans un processus général pouvant affecter tous les ARNm, semble pourtant cibler plus particulièrement ces voies de réponses aux stress. Des partenaires protéiques pourraient être impliqués dans ce recrutement spécifique de CPSF30 au niveau de certains loci. Leur identification par approche double hybride ou « Tandem Affinity Purification » (TAP) permettrait de répondre à cette hypothèse.

Nous supposons également qu'une baisse globale de l'expression de nombreux gènes, plutôt qu'une dérégulation ciblée de facteurs clés, est sans doute responsable de la suppression du phénotype de plusieurs LMMs et de la plus faible résistance d'*oxl6* à *P. syringae*. Chez les plantes, la polyadénylation alternative est impliquée dans de nombreux processus développementaux et de réponses aux stress en régulant entre autres la stabilité des transcrits et la diversité des transcriptomes (Shen *et al.* 2011). Ces processus impliquent sans doute CPSF30 qui ciblerait plus particulièrement des facteurs impliqués dans ces réponses environnementales (Hunt 2014). Cependant, les mécanismes moléculaires sous-jacents sont encore mal compris. Les travaux de Sherstnev *et al.* (2012) et de Thomas *et al.* (2012) ont démontré qu'une localisation alternative du site de polyadénylation se retrouve dans environ 70% des ARNm d'*Arabidopsis* et



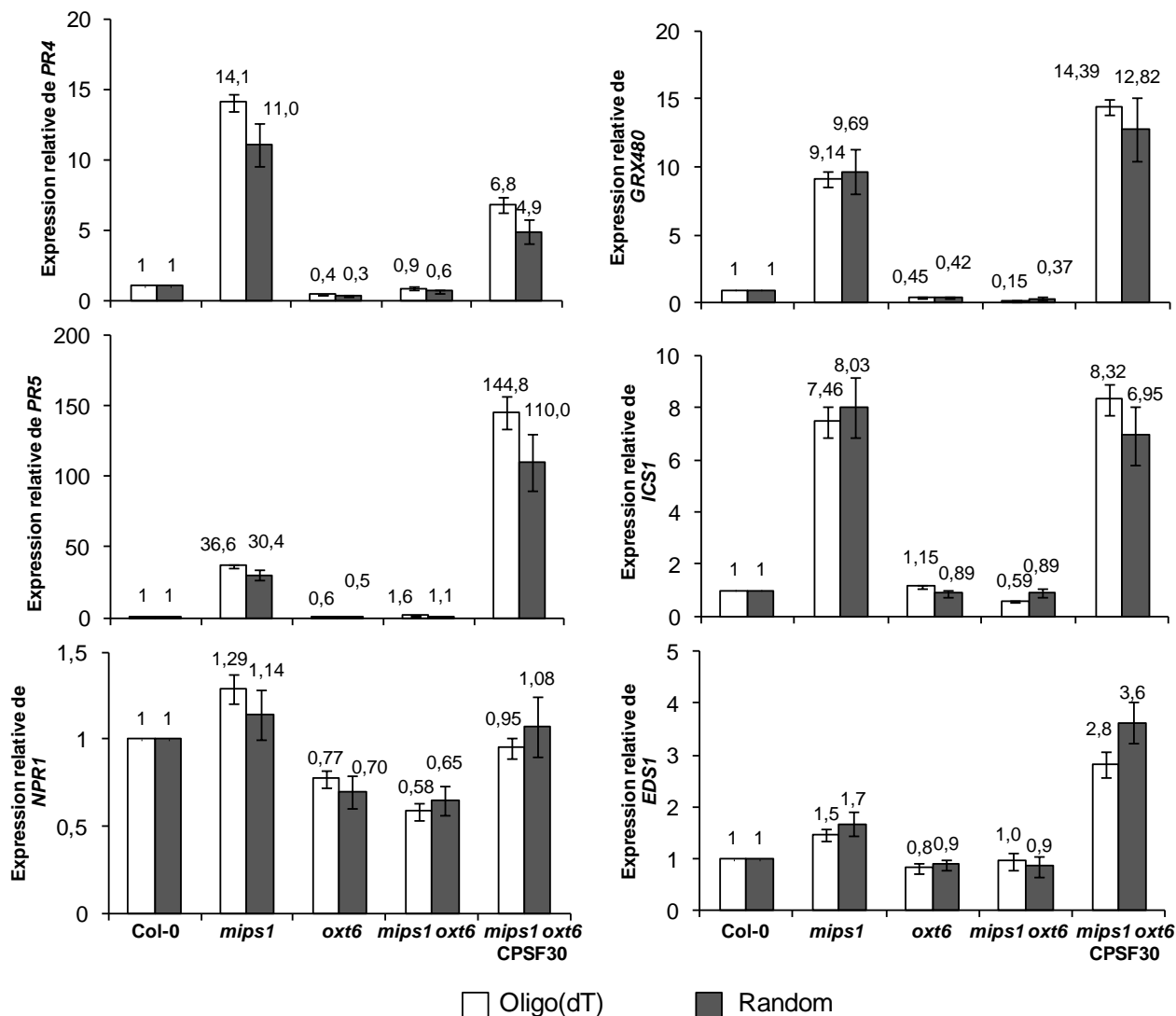
**Figure 41. Expression relative du gène *SAUR19* dans les mutants *paps1* et *oxl6* en fonction des amorces utilisées lors de l'étape de « reverse transcription » (RT).**

Les ARN ont été extraits à partir de plantules au même stade de développement pour les mutants *paps1* et *oxl6* et les sauvages correspondants (Ler pour *paps1* et Col-0 pour *oxl6*). L'étape de RT a été réalisée soit avec des amorces aléatoires (Random) soit avec des amorces composées uniquement de thymines (oligo(dT)). L'abondance relative des transcrits a ensuite été mesurée par PCR quantitative, en utilisant le gène *UBQ10* comme référence, et normalisée par rapport au génotype sauvage.

que CPSF30 est nécessaire à la localisation correcte du site de polyadénylation au sein de 47% des ARNm chez *Arabidopsis* dont certains sont sous-exprimés chez les mutants *oxf6* et *mips1 oxf6*. Cependant, ces données ont été obtenues en conditions normales de développement. Il serait intéressant de déterminer les conséquences de la mutation *oxf6* sur la localisation des sites de polyadénylation lors de stress, et plus particulièrement en cas d'interactions plantes pathogènes ou lors d'induction de la MCP. Pour cela une approche globale comparative pourra être réalisée chez les lignées *mips1* et *mips1 oxf6* grâce à la technique de « Poly(A)-Tag-Seq (PAT-Seq) », permettant de déterminer la localisation des sites de polyadénylation au sein de la majorité des ARNm (Wu *et al.* 2011).

La perte de l'activité de CPSF30 pourrait également influencer la processivité de la polyadénylation et donc la taille de la queue poly(A), avec des conséquences sur le temps de demi-vie des ARNm et leur traduction. Afin de mesurer la taille de la queue poly(A) des transcrits de certains gènes sous-exprimés dans les mutants *oxf6* et *mips1 oxf6*, j'ai utilisé une méthode accessible présentée par Vi *et al.* (2013). Dans cette étude, afin de comprendre le rôle de la protéine PAPS1 (Poly(A) Polymerase 1) dans l'immunité des plantes, les ARNs de plantes sauvages et du mutant *paps1* ont été extraits puis ont été soumis à une transcription inverse en utilisant soit des amorces composées de séquences aléatoires (Random), soit des amorces composées uniquement de thymines (oligos(dT)). Ces amorces oligo(dT) ciblent les queues poly(A) des ARNm pour démarrer la synthèse des ADNc, alors que les amorces Random permettent une transcription inverse (RT) indépendamment de la queue poly(A). Le principe est que si la queue poly(A) est raccourcie, les amorces oligo(dT) auront moins de points de fixation et la rétro-transcription sera moins efficace qu'avec les amorces Random. Ainsi, si un ARNm possède une queue poly(A) raccourcie dans un génotype particulier, son abondance, mesurée par RT-PCR quantitative (RT-PCRq), sera diminuée s'il a été rétrotranscrit avec des amorces oligo(dT), alors que s'il a été rétrotranscrit avec des amorces Random la différence ne sera pas visible. Les auteurs ont utilisé cette technique afin d'analyser l'impact de la mutation *paps1* sur la taille de la queue poly(A) d'ARNm codant des protéines Small Auxin Up RNA (SAUR). Ils en ont conclu que la protéine PAPS1 est nécessaire à l'allongement de la queue poly(A) des ARNm SAUR, notamment SAUR19 (Vi *et al.* 2013).

Dans un premier temps, j'ai testé si cette technique pouvait être reproduite au laboratoire. Pour cela, j'ai mesuré l'expression du gène *SAUR19* par RT-PCRq, en utilisant les deux types d'amorces, dans les mutants *paps1* et *oxf6* et les plantes de type sauvage correspondantes. Nous pouvons constater, que comparé au sauvage, le taux d'accumulation des transcrits de *SAUR19* est



**Figure 42. Expression relative de gènes sous-exprimés dans le mutant *oxt6*, ou impliqués dans la voie du SA, en fonction des amorces utilisées lors de l'étape de RT.**

Les ARN des génotypes Col-0, *mips1*, *oxt6*, *mips1 oxt6* et *mips1 oxt6* CPSF30 ont été extraits à partir de feuilles de rosettes de plantes âgées de 4 semaines, quatre jours après transfert en JL. L'étape de RT a été réalisée soit avec des amorces aléatoires (Random) soit avec des amorces composées uniquement de thymines (oligo(dT)). L'abondance relative des transcrits a ensuite été mesurée par PCR quantitative, en utilisant le gène *UBQ10* comme référence, et normalisée à chaque fois par rapport au génotype sauvage. Les nombres au-dessus des barres d'histogrammes représentent l'abondance relative des transcrits comparée au sauvage.

plus important dans le mutant *paps1* lorsque la RT a été effectuée avec des amorces Random, cette augmentation n'étant plus détectée si ce sont des amorces oligo(dT) qui ont été utilisées (Figure 41). Dans le contexte mutant *oxl6*, les transcrits du gène *SAUR19* sont suraccumulés quelles que soient les amorces utilisées lors de la RT ce qui indiquerait que CPSF30 n'intervient pas sur la maturation de ce transcrit (Figure 41).

Cette méthode a également été utilisée afin de déterminer si la mutation *oxl6* peut avoir une influence sur la taille de la queue poly(A) d'ARNm issus de gènes sous-exprimés dans ce génotypes et/ou impliqués dans la voie du SA (Figure 42). Les ARNs des génotypes Col-0, *mips1*, *oxl6*, *mips1 oxl6* et *mips1 oxl6* CPSF30 ont été extraits à partir de feuilles de rosette quatre jours après transfert en JL, puis l'expression des gènes indiqués a été mesurée par RT-PCRq en utilisant des amorces oligo(dT) ou Random. Nous pouvons constater que dans les lignées *oxl6* et *oxl6 mips1*, l'accumulation des transcrits ne diffère pas de manière significative selon les amorces employées lors de la RT (Figure 42). De plus, dans les génotypes développant des lésions en JL, *mips1* et *mips1 oxl6* CPSF30, aucune différence ne peut être observée en fonction de l'amorce utilisée. Ces résultats suggèrent donc que l'absence ou la présence de la protéine CPSF30 n'a pas d'influence sur la taille de la queue poly(A) des ARNm testés. Cependant, la technique utilisée peut manquer de sensibilité pour détecter de subtiles variations ou bien la protéine CPSF30 pourrait agir sur la polyadénylation d'autres ARNm non testés ce qui nécessiterait d'analyser un plus grand nombre de cibles possibles.

En conclusion, nous avons montré que CPSF30 agit positivement dans les réponses de défenses. Cependant nous n'avons pas pu élucider précisément son mode d'action à un niveau moléculaire ce qui nécessiterait une analyse plus approfondie des cibles potentielles de ce facteur. Un degré de complexité supplémentaire pourrait s'ajouter à cette boîte noire en considérant que la polyadénylation alternative est étroitement liée à l'épissage alternatif, un autre processus majeur de régulation post-transcriptionnelle de l'expression des gènes. Enfin, il a été montré que lors d'une interaction entre une version modifiée du virus de la mosaïque du tabac et *Arabidopsis*, les virus sont capables de produire des « small interfering » ARN (siARN) qui ciblent et induisent le clivage de l'ARNm codant la protéine CPSF30 (Qi *et al.* 2009) qui dans ce cas serait donc une cible directe de certains effecteurs pathogènes.



## II. Le supprimeur *mips1 somi1*

### 1. Introduction

La deuxième stratégie initiée par le laboratoire, pour identifier des facteurs impliqués dans la MCP *via* l'action du MI, était une approche de génétique directe avec le crible de supprimeurs. Parmi ces mutants, la caractérisation du supprimeur *mips1 somi1* fut initiée par Florence Prunier-Piron au laboratoire, avec la cartographie du locus *somi1* par la méthode de « Bulk Segregant Analysis ». Ensuite, par une approche de séquençage de lignées recombinantes, décrite ci-après dans l'article 3, j'ai pu montrer qu'une mutation située dans le gène *HEXOKINASE 1 (HXK1)* est responsable de la suppression des lésions dans le double mutant *mips1 somi1*.

Les hexokinases sont des enzymes du métabolisme primaire, impliquées dans la phosphorylation des hexoses qui peuvent ensuite entrer dans la glycolyse. Chez les plantes, ces enzymes ont une préférence de substrat pour le glucose et elles sont les seules capables de phosphoryler cet ose en Glucose-6-phosphate (G6P), tandis que les fructokinases, phosphorylent, elles, le fructose (Granot *et al.* 2014). Le G6P peut ensuite entrer dans la glycolyse et dans de nombreuses autres voies métaboliques comme la biosynthèse du MI lorsqu'il est pris en charge par MIPS. Le génome d'*Arabidopsis* possède six gènes codant des hexokinases qui sont divisées en deux classes : celles de type A qui possèdent un peptide d'adressage au chloroplaste, et celles de type B qui possèdent un peptide d'ancrage membranaire (Rolland *et al.* 2006). Chez *Arabidopsis*, HXK1, hexokinase de type B, possède à la fois une fonction métabolique de synthèse du G6P et un rôle clé dans la signalisation médiée par le glucose (Moore *et al.* 2003).

L'article suivant, dont la soumission est en cours, présente l'ensemble des résultats obtenus sur la caractérisation de ce supprimeur grâce à des analyses essentiellement génétiques et métaboliques.





## 2. Résultats

### Article 3 : “Involvement of the Arabidopsis Hexokinase1 in cell death mediated by *myo*-inositol accumulation”

#### Auteurs :

Quentin Bruggeman, Florence Prunier, Christelle Mazubert, Linda de Bont, Marie Garmier, Raphaël Lugan, Sylvain Merlot, Moussa Benhamed, Catherine Bergounioux, Cécile Raynaud et Marianne Delarue

#### Résumé en français

La Mort Cellulaire Programmée (MCP) est essentielle pour plusieurs aspects de la vie des plantes, dont le développement et les réponses aux stress. Des analyses génétiques ont permis d'identifier plusieurs facteurs clés de la MCP et nous avons récemment caractérisé le mutant *mips1* d'Arabidopsis déficient pour une enzyme clé catalysant une étape limitante de la biosynthèse du *myo*-inositol (MI). Une des caractéristiques les plus frappantes de *mips1* est la formation de lésions dépendantes de la lumière sur les feuilles, due à de la MCP dépendante de l'acide salicylique (SA), révélant un rôle du MI et de ses dérivés dans la régulation de la MCP. Dans cette étude, nous avons identifié un suppresseur de la MCP par un crible de mutations secondaires extra-géniques abolissant le phénotype de mort cellulaire de *mips1*. Notre crible a permis d'identifier le mutant *hxx1*, muté dans l'enzyme Hexokinase 1 (HXK1), catalysant la phosphorylation des sucres et agissant également comme un véritable senseur du glucose. Nous montrons que HXK1 est nécessaire pour la formation des lésions chez *mips1* via la voie de signalisation SA-dépendante. En utilisant 2 formes mutées catalytiquement inactives d'HXK1, nous avons également montré que l'activité catalytique de l'hexokinase est nécessaire pour la formation des lésions chez *mips1*. Des analyses en GC-MS ont révélé une restauration du contenu en MI chez *mips1 hxx1* alors qu'il est connu que l'isoforme MIPS1 est responsable de la majorité de la biosynthèse du MI dans les feuilles d'Arabidopsis. Des analyses génétiques supplémentaires montrent que ceci est dû à l'activité de l'isoforme MIPS2 alors que MIPS3 n'est pas impliquée. Ce travail définit chez les plantes une nouvelle voie de régulation de la mort cellulaire médiée par HXK1 et fait la démonstration d'une action coopérative entre deux enzymes MIPS dans un contexte métabolique particulier révélant un nouveau point de contrôle de l'homéostasie du MI chez les plantes.



## Involvement of the *Arabidopsis* Hexokinase1 in cell death mediated by *myo*-inositol accumulation.

Quentin Bruggeman<sup>a</sup>, Florence Prunier<sup>a,1</sup>, Christelle Mazubert<sup>a</sup>, Linda de Bont<sup>a</sup>, Marie Garmier<sup>a</sup>, Raphaël Lugan<sup>b</sup>, Moussa Benhamed<sup>a,c</sup>, Catherine Bergounioux<sup>a</sup>, Cécile Raynaud<sup>a</sup> and Marianne Delarue<sup>a,2</sup>

<sup>a</sup> Université Paris-Sud, Institut de Biologie des Plantes (Bâtiment 630), UMR CNRS 8618, Saclay Plant Sciences, Orsay, France

<sup>b</sup> Plateforme Métabolomique IBMP, CNRS, Institut de Botanique, Strasbourg, France

<sup>c</sup> Division of Biological and Environmental Sciences and Engineering, Center for Desert Agriculture, King Abdullah University of Science and Technology, Thuwal, Kingdom of Saudi Arabia

<sup>1</sup> Current adress : Institut de Systématique, Evolution, Biodiversité – UMR CNRS 7205, Museum National D'Histoire Naturelle, Paris, France

<sup>2</sup> Corresponding author : marianne.delarue@u-psud.fr

### ABSTRACT

Programmed cell death (PCD) is essential for several aspects of plant life, including development and stress responses. Mutational analyses have identified several key PCD components and we recently identified the *mips1* mutant of *Arabidopsis thaliana*, which is deficient for the key enzyme catalysing the limiting step of *myo*-inositol (MI) synthesis. One of the most striking features of *mips1* is the light-dependent formation of lesions on leaves due to Salicylic Acid (SA)-dependent PCD, revealing roles for MI or inositol derivatives in the regulation of PCD. Here, we identified a suppressor of PCD by screening for extra genic secondary mutations that abolish *mips1* cell death phenotype. Our screen identified the *hvk1* mutant, mutated in the hexokinase1 enzyme that catalyse sugar phosphorylation and also acts as a genuine glucose sensor. We show that HXK1 is required for lesion formation in *mips1* via SA-dependant signalling. Using two catalytically inactive HXK1 mutants, we also show that hexokinase catalytic activity is necessary for the establishment of lesions in *mips1*. GC-MS analyses revealed a restoration of the MI content in *mips1 hvk1* although it is known that the MIPS1 isoform is responsible for most of MI biosynthesis in *Arabidopsis* leaves. Further genetics analysis show that it is due to the activity of MIPS2 isoform while MIPS3 is not involved. Our work defines a pathway of HXK1-mediated cell death in plant and the demonstration of cooperative action of two MIPS enzyme under particular metabolic status highlighting a new checkpoint of MI homeostasis in plant.



## INTRODUCTION

Myo-inositol (MI) is a ubiquitous molecule and the precursor for many inositol-containing compounds that play critical and diverse roles in signal transduction, membrane biogenesis, vesicle trafficking, and chromatin remodelling (Michell, 2008; Gillasp, 2011, 2013). In higher plants inositol and inositol derivatives such as inositol phosphates, phosphatidylinositide, and sphingolipids are involved in gene expression regulation (Alcazar-Roman and Went, 2008), hormonal signalling (Tan *et al.*, 2007), biotic and abiotic stress response (Taji *et al.*, 2006), and the control of cell death (Liang *et al.*, 2003; Wang *et al.*, 2008; Berkey *et al.*, 2012). MI is also a precursor for the osmoprotectants galactinol and raffinose (den Ende, 2013). Coupling of MI with UDP-galactose to produce galactinol is catalysed by galactinol synthase (GS). Galactinol can be further reacted with sucrose to produce raffinose, and this reaction recycles MI.

Thus, MI synthesis and catabolism impact metabolites involved in many different and critical plant biochemical pathways. MI is synthesised from D-glucose in three steps: first, glucose is phosphorylated by the hexokinase (HXK), second, glucose-6-P (G6P) is converted to by the myo-inositol 1-phosphate synthase (MIPS) (Eisenberg *et al.*, 1964). This reaction is followed by dephosphorylation of myo-inositol-1-phosphate to MI, which is catalysed by the myo-inositol monophosphatase. This series of reactions are known as the Loewus pathway, which was first studied in plants and is the only known route for MI biosynthesis (Loewus and Murthy, 2000).

Although yeast and animal genomes contain a single gene encoding the MIPS protein (GhoshDastidar *et al.*, 2006), plants have multiple *MIPS* genes (Torabinejad and Gillasp, 2006). The Arabidopsis genome encompasses three MIPS isoforms that share 89 to 93% identity at the amino acid level (GhoshDastidar *et al.*, 2006; Torabinejad and Gillasp, 2006). Microarray databases, and previous works, indicate that the transcript level of *MIPS1* is predominant over that of *MIPS2* and *MIPS3* at all developmental stages except seed maturation and early germination stages when the transcript levels of *MIPS2* are comparable with that of *MIPS1*. The *MIPS3* transcript level is much lower at all developmental stages (Zimmermann *et al.*, 2004; Mitsuhashi *et al.*, 2008; Chen and Xiong, 2010). Furthermore, *MIPS1* is expressed in most Arabidopsis tissues, whereas *MIPS2* and *MIPS3* are specifically expressed in vascular or related tissues (Donahue *et al.*, 2010).

The enzyme activity of *MIPS1* in inositol biosynthesis has been demonstrated by both *in vitro* assay and yeast complementation (Johnson and Sussex, 1995). Consistent with gene expression data, MIPS1 appears to be responsible for most of MI biosynthesis in leaves since MI levels are reduced in *mips1* but not in *mips2* and *mips3* null mutants (Meng *et al.*, 2009; Donahue



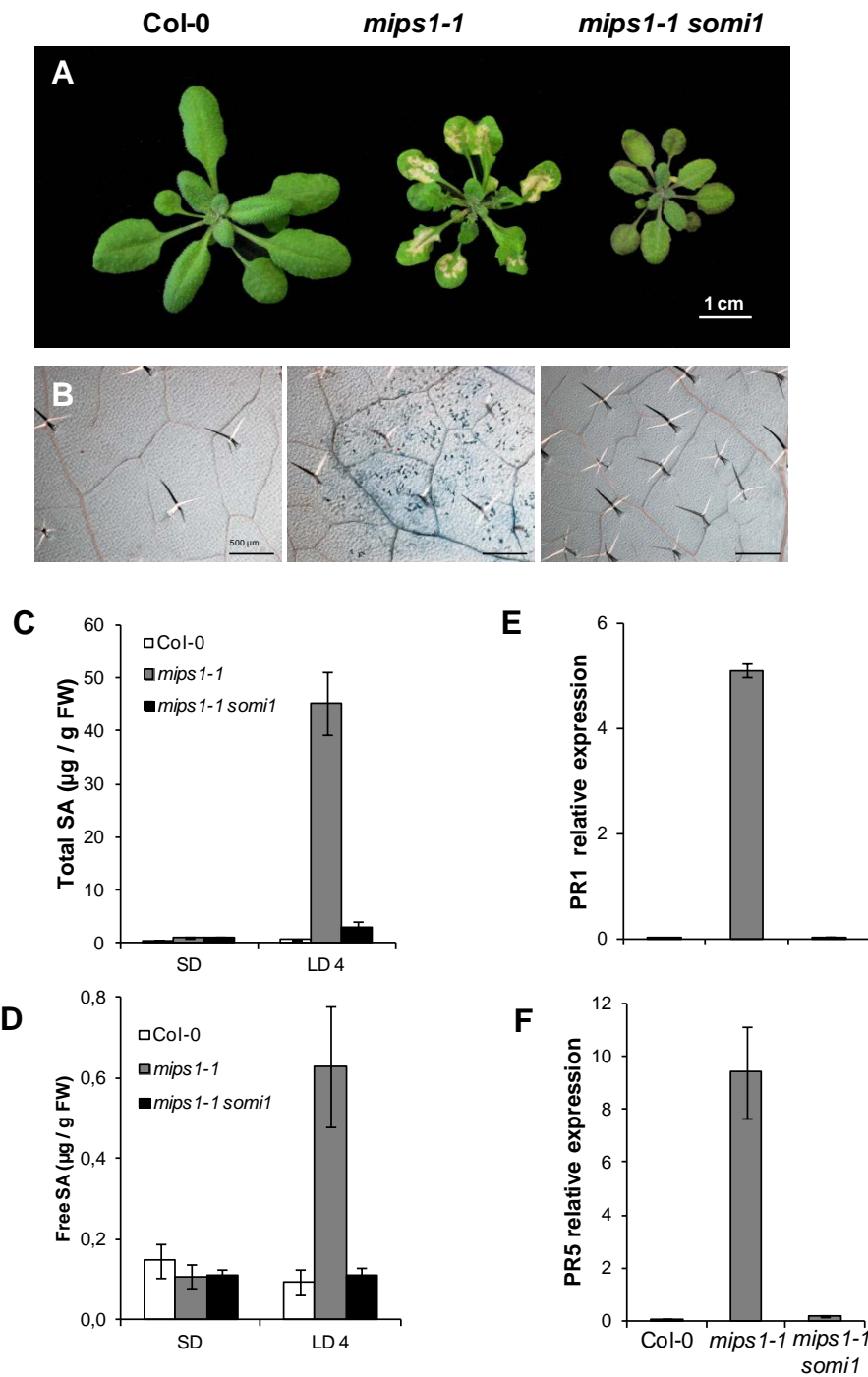
*et al.*, 2010). Consequently, *mips1* mutants are dramatically impacted during growth and development while *mips2* and *mips3* mutants appear phenotypically normal. *mips1* mutant displays pleiotropic developmental defects such as reduced root growth or altered venation in cotyledons (Meng *et al.*, 2009; Chen and Xiong, 2010; Donahue *et al.*, 2010). Moreover, one of *mips1* mutant most striking features is the light-dependent formation of leaf lesions due to SA-dependent Programmed Cell Death (PCD) (Meng *et al.*, 2009; Donahue *et al.*, 2010). PCD is essential for several aspects of plant life, including development and stress responses. Incompatible plant-pathogen interactions are well known to induce the hypersensitive response (HR), a localized cell death due to PCD. How MI levels can regulate PCD is not clear. It has been shown that peroxisomal H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> induces the formation of SA-dependent lesions in the *catalase 2* (*cat2*) *Arabidopsis* mutant and the expression of disease resistance genes only under lowered MI levels (Chaouch and Noctor, 2010). In addition, we have shown that MIPS1 positively regulates its own expression by inhibiting the activity of histone methyl-transferases, and that this positive feedback loop is abolished by flagellin treatment (Latrasse *et al.*, 2013). Hence, the tissue content of MI could be a key factor in defence responses, but the underlying molecular mechanisms remain to be unravelled.

Using a candidate gene approach, we recently identified a polyadenylation factor subunit, CLEAVAGE AND POLYADENYLATION SPECIFICITY FACTOR 30 (CPSF30), as a regulator of MI-dependent plant PCD. We showed that CPSF30 activity was required for lesion formation in *mips1* via SA-dependant signalling (Bruggeman *et al.*, 2014). Furthermore, CPSF30 activity was also necessary for PCD establishment in *catalase 2* (*cat2*), *lesion-simulating disease 1* (*lsd1*), *constitutive expressor of pathogenesis-related genes 5* (*cpr5*) and *mitogen-activated protein kinase 4* (*mpk4*) *Arabidopsis* mutants, indicating that post-transcriptional regulations play a key role in the control of PCD.

To gain further insight into the molecular mechanisms involved in MI-dependent cell death, we performed a screen for extragenic secondary mutations, which abolish lesion formation in *mips1*. We report here that a mutation in the Hexokinase 1 (HXK1) enzyme suppresses *mips1* light-dependent PCD.

In plants, HXK are the only enzymes that can phosphorylate glucose. Multiple isoforms of HXK are found in most organisms and six *HXK* genes have been found in *Arabidopsis*. Type B HXK (*AtHXK1* or *HXK1*) was the most studied over the last years and was clearly identified as a core component in plant sugar sensing and signalling (Granot *et al.*, 2014). Indeed, in bacteria, yeast, animals, and plants, hexokinases not only catalyse sugar phosphorylation as the first step of hexose metabolism but also sense glucose levels and transmit the sugar signal to the nucleus





**Figure 1. *mips1*-dependant cell death suppression by the *somi1* mutation** A, Suppression of *mips1*-mediated cell death in the *mips1-1 somi1* background. Plants were grown for one week *in vitro*, then 14 days in Short-Day (SD) conditions in soil and photographed five days after transfer to Long-Day (LD) conditions. Bar = 1 cm. B, Trypan blue staining confirm the absence of cell death in the suppressor *mips1 somi1*. Bar = 500  $\mu$ m. C and D, Total (C) and Free SA (D) levels in the indicated genotypes, with means and standard deviations calculated from four biological replicates. Plants were grown in SD conditions and transferred to LD conditions for 4 days (LD 4). FW: Fresh weight. E and F, Real-time RT-PCR analysis of *PR1* (*AT2G14610*) and *PR5* (*AT1G75040*) expression in rosette leaves from indicated genotypes, 4 days after transfer in LD conditions. Transcript abundance is expressed relative to *UBQ10* (*AT4G05320*) transcripts abundance.

(Rolland *et al.*, 2006). The role of HXK1 has been investigated by exposing plant cells and seedlings to HXK substrates or analogues and by overexpressing and down-regulating *HXK1* in *planta* (Jang *et al.*, 1997). Isolation and characterization of the Arabidopsis *HXK1* mutants, called *glucose-insensitive2* (*gin2*), clearly identify HXK1 as a genuine glucose sensor that mediates sugar sensing independently of its glucose phosphorylation activity thereby coordinating sugar availability with plant physiology and development (Moore *et al.*, 2003). Uncoupling of metabolic and signalling activity was confirmed by the construction and analysis of two catalytically inactive *HXK1* alleles. Although these forms of HXK1 are deficient in ATP binding (G104D) and phosphoryl transfer (S177A), respectively, they restore wild-type growth, repression of photosynthetic gene expression, and hormone responsiveness when expressed in a *gin2* background (Moore *et al.*, 2003).

Here, we show by genetic approaches, an epistatic relationship between *mips1* and *hxx1* mutants, and that PCD triggered by a decrease in MI content and SA accumulation can be reverted by a second *hxx1* mutation.

## RESULTS<sup>1</sup>

### Suppression of cell death and defence responses of *mips1* by *somi1*

The most striking aspect of *mips1* mutants' phenotype is the spontaneous lesion formation observed when plants were transferred in Long Days (LD), whereas when grown under Short Days (SD), mature *mips1* mutants are indistinguishable from the wild-type (Meng *et al.*, 2009). To understand the mechanism of how MIPS1 negatively regulates cell death, a screen for suppressors of *mips1-1* was performed using ethylmethanesulfonate (EMS) mutagenesis. A total of  $\approx 50$  suppressors of *mips1* (*somi*) mutants were identified. The *somi1* was further characterized in detail in this study.

Four days after transfer in restrictive LD conditions, cell death was obvious in *mips1-1*, whereas the leaves of the *mips1-1 somi1* double mutant did not show any cell death (Fig. 1A). Trypan blue staining (Fig. 1B) and ion leakage measurements (Supplemental Fig. S1A) confirmed this observation.

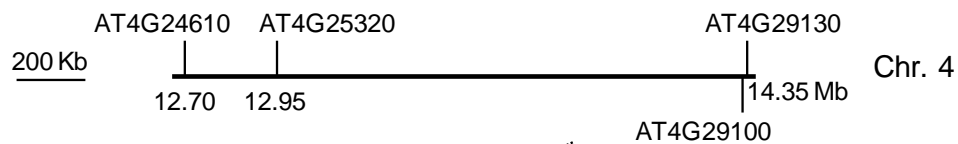
Since lesion formation in *mips1-1* is SA-dependent, we measured the effect of the *somi1* mutation on SA content in the *mips1-1* background. As previously reported (Meng *et al.*, 2009), free and total SA contents were similar in the different backgrounds under permissive conditions but dramatically increased in the *mips1-1* mutant 4 days after transfer to restrictive conditions

<sup>1</sup> Pour information, les figures sont situées en vis-à-vis du texte et les figures supplémentaires commencent après la figure 7.

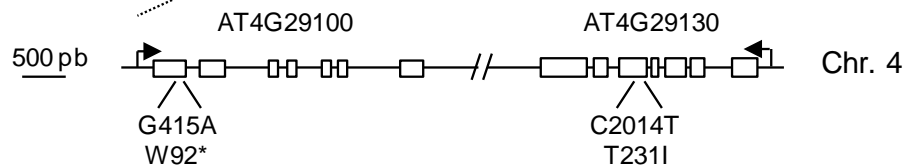
### Bulk Segregant Analysis



### Deep Sequencing



### CAPS markers



### Figure 2. Mapping of the *som1* mutation

A Bulk Segregant Analysis (BSA) was performed using F2 from the cross between *mips1-1 som1*, in Col-0 background, and *mips1-2*, WS background, and revealed that *som1* was flanked by markers MSAT4.15 and MSAT4.33 on chromosome 4 (Chr. 4). High throughput sequencing of nuclear DNA obtained from a bulk of 156 F2 plants without lesions in LD identified 4 candidate genes (*AT4G24610*, *AT4G25320*, *AT4G29100* and *AT4G29130*). Cleaved Amplified Polymorphic Sequences (CAPS) markers were used on 30 *mips1-1 som1* plants to remove SNP mutations not linked to the *som1* locus. Two genes remained after this step: *AT4G29100*, encoding a putative DNA binding protein, and *AT4G29130*, encoding the HEXOKINASE 1 (HXK1). Mutations introduced an early stop or an amino acid change of Threonine to Isoleucine, in *AT4G29100* and *HXK1* genes, respectively.

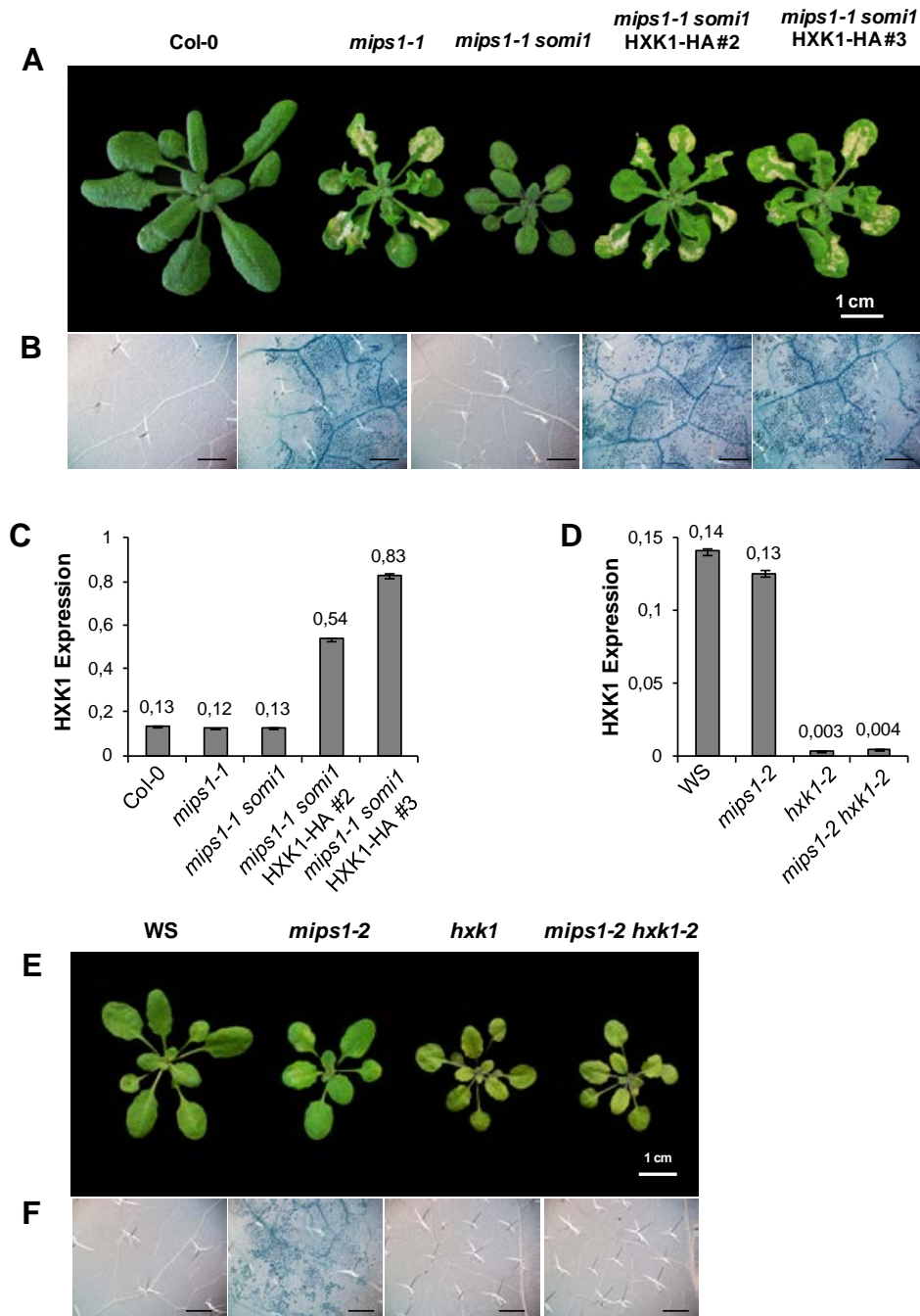
(Fig. 1C,D). This increase in SA was abolished in *mips1-1 somi1* double mutants. In addition, the *somi1* mutation led to a dramatic down-regulation of the SA pathogenesis-related marker transcripts *PATHOGENESIS-RELATED 1 (PR1)* and *PATHOGENESIS-RELATED 5 (PR5)* (Fig. 1E,F) in *mips1-1 somi1* compared to their constitutive expression in *mips1-1*.

Two others striking phenotypes of the *mips1* mutant were defects in primary root development and alteration in cotyledons morphology which was in part due to mislocalization of the auxin carrier PIN (Meng *et al.*, 2009; Chen and Xiong, 2010; Donahue *et al.*, 2010; Luo *et al.*, 2011). Nevertheless, the shorter primary root observed in *mips1-1* was not suppressed in the *mips1-1 somi1* mutant (Supplemental Fig. S1B). To investigate whether the alteration in cotyledons are suppressed by the *somi1* mutation, we classified cotyledon abnormalities in four classes according to the severity of the phenotype (Supplemental Fig. S1C). The *mips1-1 somi1* displayed similar proportion of plants with severe cotyledons defects as the *mips1-1* mutant.

Taken together, these results suggest that *somi1* mutation specifically suppresses *mips1-1*-dependent lesions by blocking events that lead to cell death upstream of the SA accumulation without impact on other *mips1* phenotypes.

### **SOM1 encodes the HXK1 hexokinase**

To map the *somi1* mutation, *mips1-1 somi1* plants in the Columbia-0 (Col-0) background, were crossed with an allelic mutant of *mips1-1*, the *mips1-2* allele in the Wassilewskija (WS) background. Bulk Segregant Analysis (BSA) was performed using F2 plants without (n=22) or with lesions (n=22) in LD, and revealed that *somi1* was flanked by microsatellite markers MSAT4.15 and MSAT4.33, on a region of  $\approx 8$  Mb on chromosome 4 (Fig. 2). Further mapping was performed by a high throughput sequencing of nuclear DNA obtained from a bulk of 156 F2 plants without lesions in LD. Sequence analysis using the Col-0 genome as reference, revealed that in the region previously mapped by BSA, four candidate genes (*AT4G24610*, *AT4G25320*, *AT4G29100* and *AT4G29130*) presented a Single Nuclear Polymorphism (SNP) in 100% of paired-end reads (Fig. 2). After two backcrosses of *mips1-2 somi1* with *mips1-2* single mutant to clean background mutations, Cleaved Amplified Polymorphic Sequences (CAPS) markers were used on 30 *mips1-2 somi1* plants to eliminate SNP mutations that did not account for lesion suppression. Two genes remained after this step: *AT4G29100*, encoding a putative DNA binding protein, and *AT4G29130*, encoding Hexokinase 1 (AtHXK1, hereafter called HXK1). Mutations introduced a stop or an amino acid change of Threonine to Isoleucine, in the *AT4G29100* and *HXK1* genes, respectively. In the *HXK1* gene, this mutation induced the replacement of a polar



**Figure 3. The *somi1* locus corresponds to *HXK1***

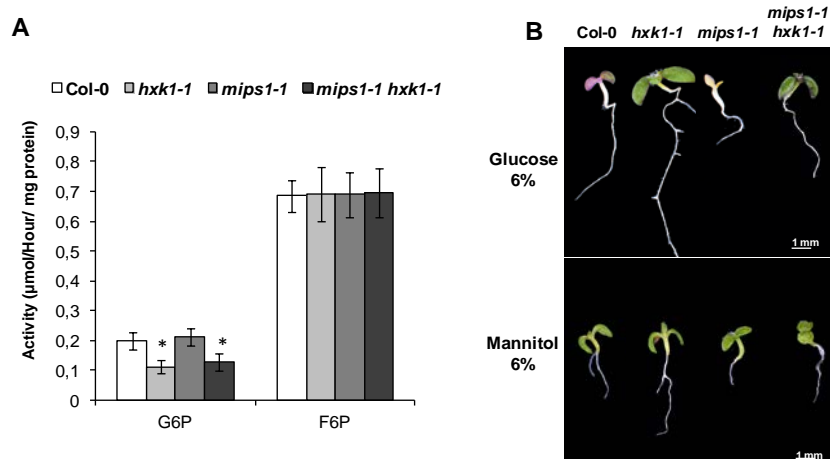
A, Transformation of the *mips1-1 somi1* suppressor with a cDNA encoding the wild-type form of *HXK1* fused to a hemagglutinin (HA) tag restores lesions in 2 independent transgenic lines (*mips1-1 somi1* HXK1-HA #2 and #3). B and F, Trypan Blue staining confirmed the cell death phenotype of the different indicated lines. Bar = 500  $\mu$ m. C and D, RT-qPCR analysis of the *HXK1* expression in indicated lines in SD conditions. Transcript abundance is expressed relative to *UBQ10* (AT4G05320) transcripts abundance. E, T-DNA mutant *hxx1-2* (Flag\_346H03), with an insertion in the promoter of the *HXK1* gene, abolishes lesions that normally occur in *mips1-2*. These lines are in the WS background. A and E, Plants were photographed 5 days after transfer in LD conditions. Bar = 1cm.

amino acid by an apolar residue, within a region highly conserved in Animal, Plant and Fungi kingdoms (Supplemental Fig. S2).

To identify the *som1* locus, complementation of *mips1-1 som1* mutant with wild-type forms of *AT4G29100* and *HXK1* genes was performed. While complementation with *AT4G29100* gene did not restore lesion formation (data not shown), independent *mips1-1 som1* transgenic lines expressing wild-type *HXK1* fused to Hemagglutamin tag (HXK1-HA) showed identical lesions to *mips1-1* in LD conditions (Fig. 3A, B). RT-qPCR analysis of two independent complemented lines *mips1-1 som1* HXK1-HA#2, and *mips1-1 som1* HXK1-HA#3, showed that *HXK1* transcripts were slightly over-accumulated in these lines, while *mips1-1* and *mips1-1 som1* mutants presented a similar level of *HXK1* gene expression to the wild-type (Fig. 3C). To confirm the involvement of HXK1 in *mips1-1*-dependent cell death, we crossed the *mips1-2* mutant with the *hxx1-2* T-DNA mutant (Flag\_346H03). The T-DNA insertion was located in the promoter of *HXK1*, inducing a very low expression of this gene in *hxx1-2* and *mips1-2 hxx1-2* mutants (Fig. 3D). *mips1-2 hxx1-2* did not show any lesions in LD (Fig. 3E, F), confirming that disruption of *HXK1* suppresses MI dependent cell death. Expression analysis showed that the over-expression of the immune markers *PR1* and *PR5*, suppressed in *mips1-1 som1*, was restored by complementation with wild-type *HXK1*, in *mips1-1 som1* HXK1-HA#2, and *mips1-1 som1* HXK1-HA#3 lines (Fig. S3A). Over-expression of *PR1* and *PR5* was also observed in *mips1-2*, in LD conditions, but was suppressed in *mips1-2 hxx1-2* double mutants (Fig. S3B). According to these results, it was obvious that the mutation located in the *HXK1* gene was responsible for the suppression of *mips1* dependent cell death in the *som1* suppressor hereafter referred as *hxx1-1* allele.

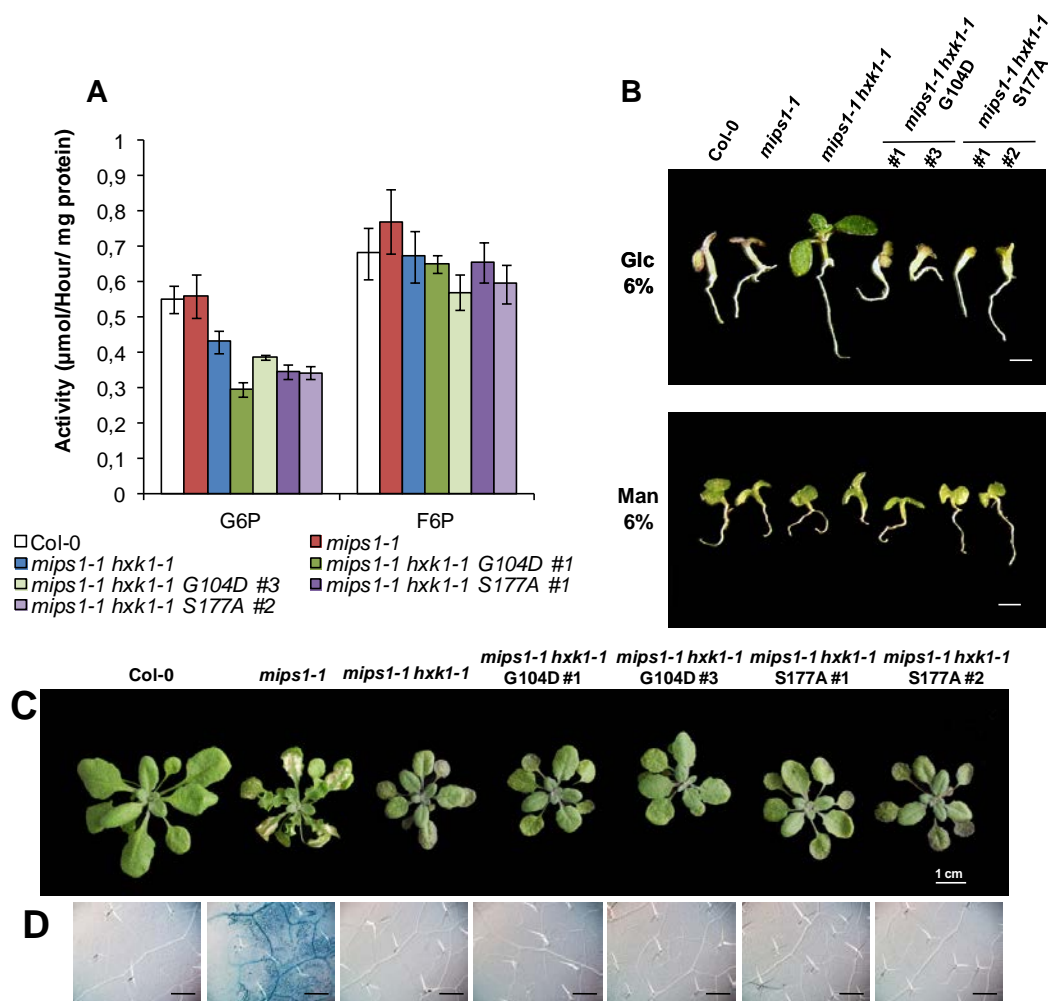
### **The *hxx1-1* mutation affects both the metabolic activity and the glucose signalling function of HXK1**

*HXK1* encodes a bi-functional enzyme that mediates sugar sensing in addition to its involvement in hexose phosphorylation, thereby coordinating sugar availability with plant physiology and development. Hence, the consequences of *hxx1-1* mutation could be due to an effect on HXK1 protein catalytic activity and/or HXK1 signalling functions. To analyse whether the *hxx1-1* mutation resulted in reduced hexokinase activity, we measured glucose and fructose phosphorylation activity using protein extracts isolated from wild-type, *hxx1-1*, *mips1-1* and *mips1-1 hxx1-1* lines. Leaves of *hxx1-1* and *mips1-1 hxx1-1* mutants displayed  $\approx 56\%$  and  $60\%$  of the glucose phosphorylation activity of the wild-type control and *mips1-1* leaves, respectively, whereas the fructose phosphorylation activity was similar to that of the control (Fig. 4A). The



**Figure 4. Effect of the *hxx1-1* mutation on HXK1 functions**

A, Glucokinase and fructokinase activity measurements show the effect of indicated mutations on the synthesis of glucose-6-phosphate (G6P) and fructose-6-phosphate (F6P). Samples were harvested two days after transfer in LD conditions, and means and standard errors were calculated from four biological replicates. \* student t-test :  $p < 0.05$ . B, Glucose sensitivity assays. Plants were grown on 1/2 MS medium supplemented with 6% glucose (Glc) or 6% mannitol (Man) 1, for 10 days.



**Figure 5. The catalytic but not the signalling function of HXK1 is required for lesion formation.**

*mips1-1* mutation alone did not affect either phosphorylation activity. A decrease in glucose phosphorylation was also observed in *hxx1-2* and *mips1-2 hxx1-2* lines (Fig. S4A). Because hexokinases have a preferential affinity for glucose, these results suggested that the *hxx1-1* mutation affects hexokinase activity.

In order to test glucose sensitivity of the seedlings, a widely used test is based on the ability to develop normally on otherwise inhibitory concentrations of exogenous glucose in which wild-type plants display inhibited cotyledon expansion, chlorophyll accumulation, and shoot growth at the seedling stage development (Rolland *et al.*, 2006). Therefore, seedling growth of the various mutants was assessed in the presence of 6% glucose. As shown Fig. 4B, *hxx1-1* and *mips1-1 hxx1-1* mutants were able to overcome the developmental arrest displayed by wild-type control plants whereas wild-type and *mips1-1* single mutants showed glucose-dependent developmental arrest and repression of chlorophyll accumulation. The same response was observed for lines in the WS background (Fig. S4B). As osmotic control, all lines were shown to have a similar phenotype on MS plates with 6% mannitol (Fig. 4C). These results indicate that the *hxx1-1* mutant was affected in both its metabolic activity and signalling function.

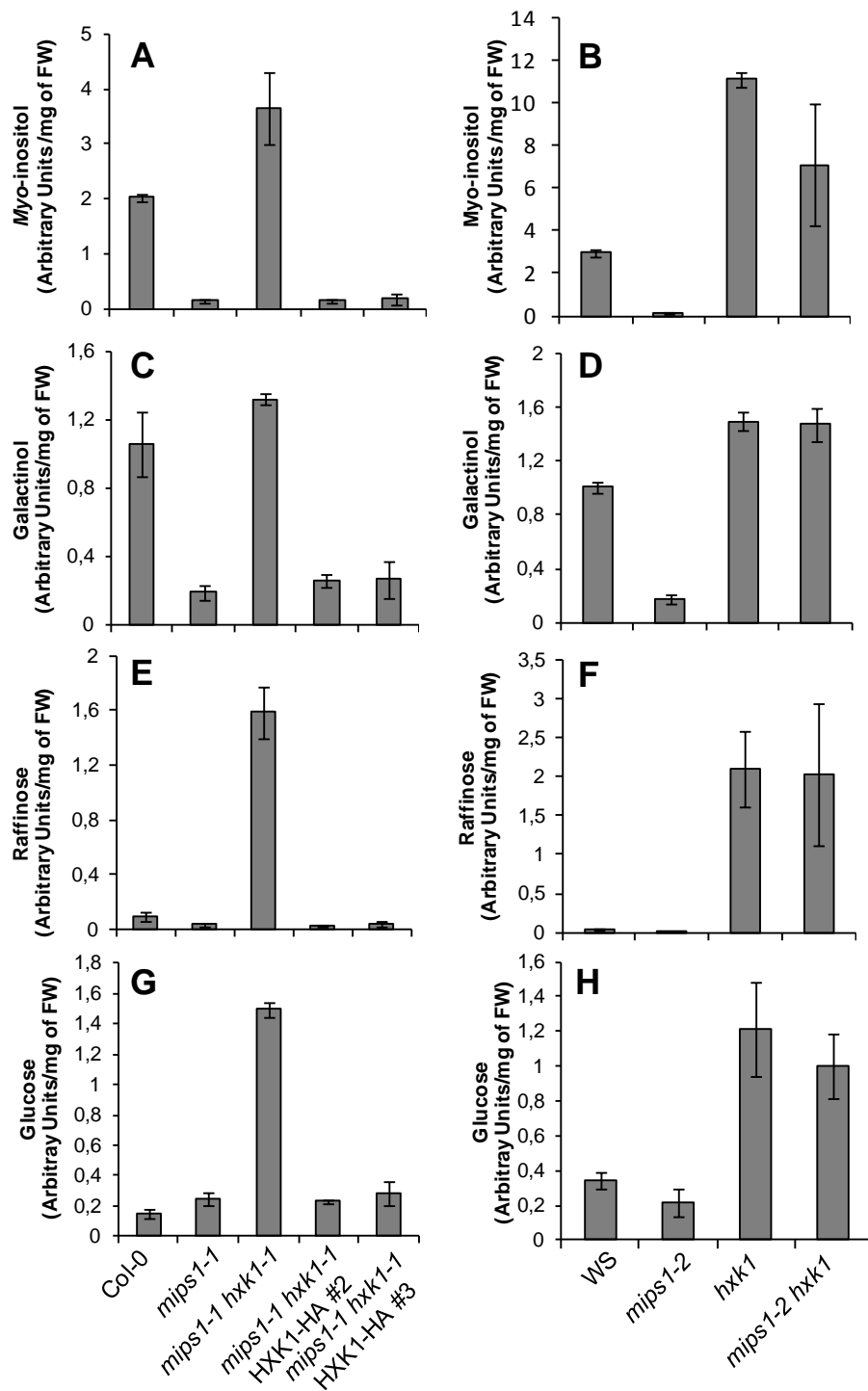
### Hexokinase activity is necessary for the establishment of lesions in *mips1*

In order to test whether the involvement of HXK1 in cell death relies on its signalling functions or on its glucose phosphorylation activity, we used targeted mutagenesis to produce HXK1 mutants that retain signalling functions but not catalytic activities. We generated the two catalytically inactive HXK1 mutants described by Moore *et al.* (2003): one that eliminated adenosine triphosphate binding [Gly<sup>104</sup> → Asp<sup>104</sup> (G104D)] and another that prevented phosphoryl transfer [Ser<sup>177</sup> → Ala<sup>177</sup> (S177A)] but both maintained the glucose-binding site (Ma *et al.*, 1989; Kraakman *et al.*, 1999). It has been previously shown that these two catalytically inactive mutants exhibited a similar glucose signalling function as the wild-type HXK1 in repressing two promoters of photosynthesis genes (Moore *et al.*, 2003). Hence, to further evaluate the respective roles of glucose signalling and metabolism during lesion formation, we generated

#### Figure 5, legend.

A, Glucokinase and fructokinase activity measurement in *mips1-1 hxx1-1* complemented with catalytically inactive forms of HXK1. Amino acids changes such as Gly 104 to Asp (G104D) and Ser 177 to Ala (S177A) deactivate the kinase activity of HXK1. The suppressor *mips1-1 hxx1-1* was transformed with constructs encompassing the HXK1 protein with the G104D or with the S177A amino acids changes fused to a HA tag. Hexokinase activity was measured from 2 independent transgenic lines (*mips1-1 hxx1-1* G104D #1 and #3, and *mips1-1 hxx1-1* S177A #1 and #2). Means and standard errors were calculated from four biological replicates. G6P, glucose-6-phosphate; F6P, fructose-6-phosphate. B, Glucose sensitivity assays. Plants were grown on 1/2 MS medium supplemented with 6% glucose (Glc) or 6% mannitol (Man), for 10 days. C, Cell death phenotypes of the indicated lines after 5 days in LD conditions. Bar = 1 cm. D, Trypan blue staining confirms the cell death phenotype of the different indicated lines. Bar = 500 µm.





**Figure 6. Suppression of *mips1-1*-dependent cell death correlates with metabolites changes.**

GC-MS analysis was performed to determinate *myo*-inositol (A, B), galactinol (C, D), raffinose (E, F) and glucose (G, H) relative contents in rosette leaves of indicated lines. In the cell, *myo*-inositol is fused to galactose to produce galactinol which is subsequently transformed in raffinose. Samples were harvested 4 days after transfer in LD conditions. Means and standard deviations were calculated from four biological replicates. Fw, Fresh weight.

independent transgenic plants, *mips1-1 hxk1-1* S177A and *mips1-1 hxk1-1* G104D, which expressed the two catalytically inactive *HXK1* mutant alleles in the *mips1-1 hxk1-1* background. Measurements of glucose phosphorylation activity (Fig. 5A) and of glucose sensitivity (Fig. 5B), confirmed that the complementation with catalytically inactive forms was able to restore the response to glucose whereas production of G6P was still lower than in the wild-type control. As shown on Fig. 5C,D four days after transfer in restrictive LD conditions, as expected, cell death was obvious in *mips1-1*, whereas the leaves of the *mips1-1 hxk1-1* and wild-type Col-0 did not show any cell death. Two independent transgenic lines for each *HXK1* catalytically inactive forms, did not display lesion on leaves as wild-type and *mips1-1 hxk1-1* double mutant. Thus, these results suggested that *HXK1* catalytic activity is necessary for the establishment of the lesions in the double mutants *mips1 hxk1*.

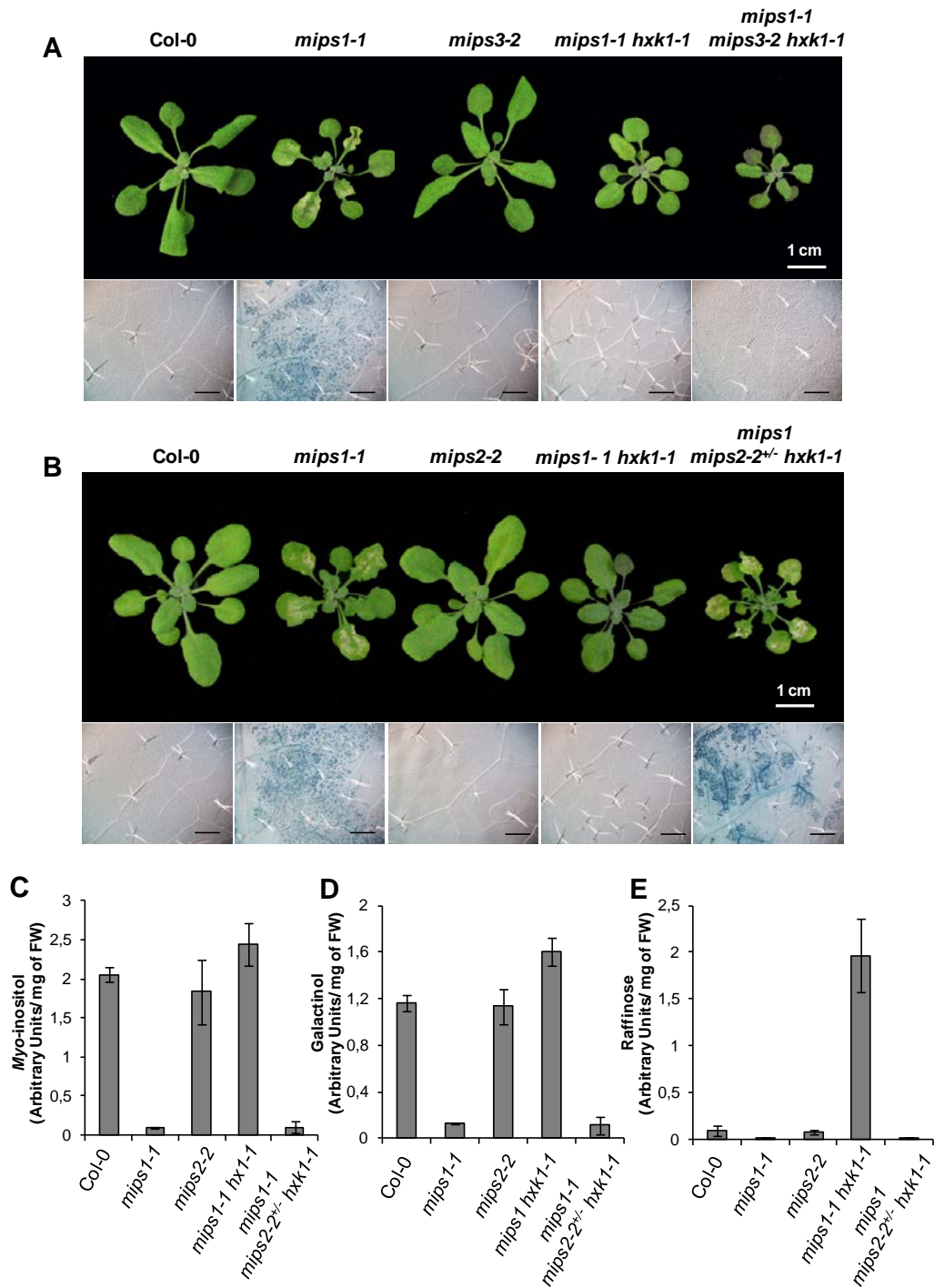
### **Restoration of MI content in *mips1* mutants by *hxk1* mutations**

In *mips1* mutant, the induction of PCD was clearly attributed to the reduced MI or galactinol accumulation since treatment of mutants with either compound was able to suppress lesion formations (Meng *et al.*, 2009). Using GC-MS analysis, we quantified MI in the different mutants and complemented lines. Surprisingly, while, as expected, MI content was strongly decreased in *mips1-1* and *mips1-2* mutants compared to the corresponding wild type, this compound over-accumulated in *mips1-1 hxk1-1* and *mips1-2 hxk1-2* mutants and also in *hxk1-2* single mutant (Fig. 6A, B). In *mips1-1 hxk1-1* *HXK1*#2 and *mips1-1 hxk1-1* *HXK1*#3 complemented lines, MI content was found again at a very low level, similar to what is observed in the *mips1-1* mutant (Fig. 6A). As shown on Fig. 6 C-F, measurements of galactinol and raffinose contents led to the same results: a restoration of their content by mutation of *HXK1* in the *mips1* mutant background could be responsible of the suppression of MIPS1-dependant cell death.

As expected, an over-accumulation of the glucose, the immediate substrate of the hexokinase, was also detected in both *hxk1* allele backgrounds, which was abolished by complementation with wild-type copy of the enzyme.

### **MIPS2 is responsible for MI production in *mips1 hxk1* mutants**

Although organisms incorporate MI into various compounds, the Loewus pathway is the only biosynthetic route to produce MI. Genetics analyses previously demonstrated that in *Arabidopsis*, the MIPS1 isoform is responsible for most of MI biosynthesis in leaves. Thus, in this context, a restoration of MI content in the absence of functional MIPS1 enzyme was surprising. However, evidence exists that a minor pathway to ascorbic acid synthesis could proceed via MI



### Figure 7. Roles of MIPS2 and MIPS3 in cell death suppression

The suppressor *mips1-1 hxx1-1* was crossed with *mips2-2<sup>+/−</sup>* and *mips3-2* single mutants to obtain corresponding triple mutants. A and B, rosette leaves pictures and trypan blue staining after transfer in LD conditions of *mips1-1 mips2-2<sup>+/−</sup> hxx1-1* and *mips1-1 mips3-2 hxx1-1* mutants to reveal cell death phenotypes. Photographs bar = 1 cm; Trypan blue bar = 500μm. C to E, Metabolite levels, such as *myo*-inositol (C), galactinol (D) and raffinose (E) were analyzed in the indicated lines by GC-MS method. Means and standard deviations were calculated from four biological replicates. Fw: Fresh weight.

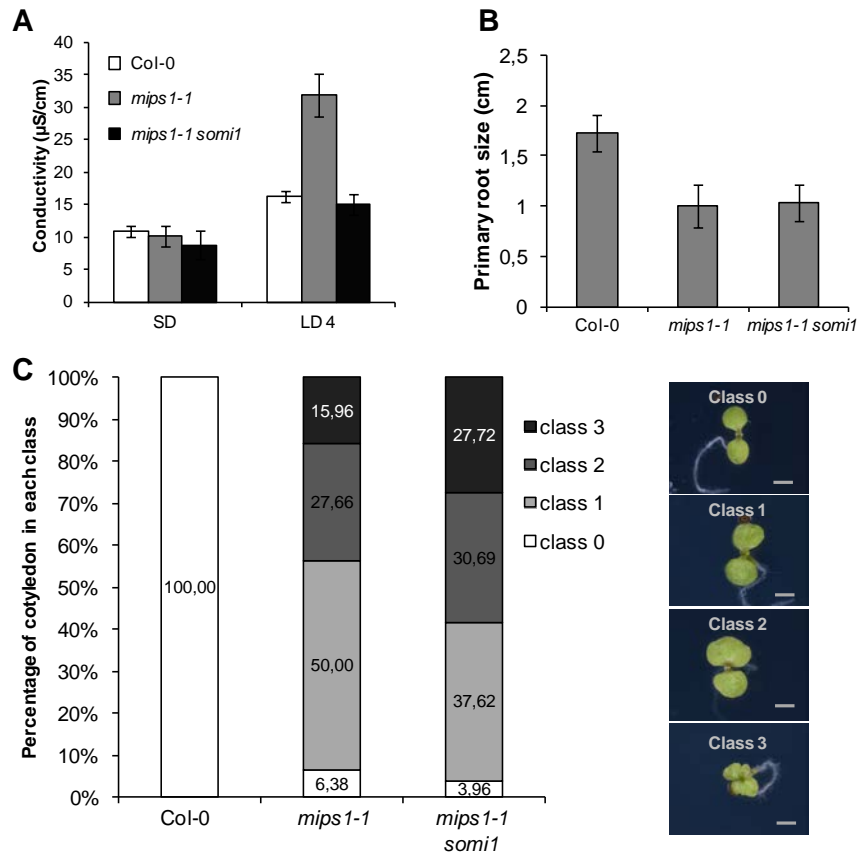
synthesis (Radzio *et al.*, 2003; Lorence *et al.*, 2004; Torabinejad *et al.*, 2009). It has been previously shown that the *vitamin c 4 (vtc4)* mutant, impaired in a L-galactose-1-P phosphatase, a plant ascorbic acid biosynthetic enzyme (Conklin *et al.*, 2006), has reduced MI levels, suggesting such a connection between these pathways (Torabinejad *et al.*, 2009). Hence, in order to test whether MI accumulation observed in *mips1 hxx1* double mutant could originate from this pathway, this double mutant was crossed with the *vtc4* mutant. Because no restoration of cell death was observed in *hxx1 mips1 vtc4* triple mutants (data not shown), this alternative pathway could be excluded as responsible of restoration of the MI content in *mips1 hxx1* double mutant.

As the Arabidopsis genome contains three *MIPS* genes, we hypothesized that one or the two MIPS2 and MIPS3 enzymes could be responsible for MI levels restoration observed in the *mips1-1 hxx1* suppressor. To test this, we crossed *mips1-1 hxx1-1* with *mips2-2* or *mips3-2* mutants to obtain the corresponding triple mutants.

As shown Fig. 7A, a mutation in the *MIPS3* gene was not able to rescue the *mips1* cell death phenotype in *mips1-1 hxx1-1* double mutant background. As stated by Luo *et al.* (2011), *mips1 mips2* double mutant is embryo lethal. We thus generated a *mips1-1 mips2-2<sup>+/-</sup> hxx1-1* line in order to avoid embryo defective phenotype. As shown on Fig. 7B, this triple mutant obviously displayed lesions on leave indicating that in *mips1-1 hxx1-1*, cell death suppression is likely due to the action of MIPS2.

In order to confirm this result, MI, galactinol and raffinose assays were performed. While as expected, contents of these compounds were almost comparable to the wild-type control in *mips2-2* null mutant, MI, galactinol and raffinose levels, were similar in *mips1-1 mips2-2<sup>+/-</sup> hxx1* to the levels observed in *mips1-1*, confirming that in this context, the action of MIPS2 is necessary for MI production (Fig. 7C-E).

Although the metabolic events connecting a restoration of the MI content with changes in HXX1 activity is unknown, one simple explanation would be that in the *mips1* background, the *hxx1* mutation affects transcriptional regulation of *MIPS2* by modification of glucose homeostasis for instance, leading to *MIPS2* over-expression and subsequently to a restoration of the MI production. However, quantitative RT-PCR did not detect an over-accumulation of the *MIPS2* transcript in *mips1-1 hxx1-1*. Actually the expression was slightly decreased compare to the wild-type (Fig. S5). Nevertheless, in the single *mips1-1* mutant, *MIPS2* transcripts accumulation was four times lower than in wild type in LD conditions (Fig. S5), and this down-regulation was partially rescued in *mips1 hxx1* double mutants. This suggests that PCD in *mips1* could result from *MIPS2* down-regulation in LD, and that disruption of HXX1 activity could prevent the repression of *MIPS2* thereby restoring normal MI accumulation and preventing lesion formation.



**Figure S1. Phenotypic analyses of *mips1-1 hxl-1* suppressor.**

A, Ion leakage assays, with means and standard deviations calculated from six leaf discs per treatment with three replicates per experiment, in SD and 4 days after transfer in LD conditions (LD 4). B, Primary root length of the indicated genotypes. C, Relative proportion of each cotyledon classes in the indicated genotypes.

*A. thaliana* FPKQTSLSGSLIKHTKGFSTEEAVGQDVVGALNKALERYG-LDMRTAALYNDTVGTLGGRY-YNPDVVAAYILGTGTNAAYVERATIPKWH-GL--  
*N. benthamiana* FPKQTSLSGSLIKHTKGFSTEEAVGQDVVGELTKAMRKKG-VDMRVSAALYNDTVGTLGGRY-YNDVVAAYILGTGTNAAYVERVQIPKWH-GP--  
*V. vinifera* FPKQTSLSGSLIKHTKGFSTEEAVGQDVVGELTKAMERIG-LDMRVSAALYNDTVGTLGGRY-YNDVVAAYILGTGTNAAYVERAQSIPKWH-GL--  
*P. patens* FPKQTSLSGSLIKHTKGFSTEEAVGQDVVGELTKAMERIG-LDMRVSAALYNDTVGTLGGRY-YNDVVAAYILGTGTNAAYVERAQSIPKWH-GL--  
*O. sativa* FPKQTSLSGSLIKHTKGFSTEEAVGQDVVGELTKAMERIG-LDMRVSAALYNDTVGTLGGRY-YNDVVAAYILGTGTNAAYVERAQSIPKWH-GL--  
*S. cerevisiae* YPASQNKINEGILQRHTKGFSTEEAVGQDVVGELTKAMERIG-LDMRVSAALYNDTVGTLGGRY-YNDVVAAYILGTGTNAAYVERAQSIPKWH-GL--  
*C. reinhardtii* FAVEQSGLAAGKLLDHTKGFSTEEAVGQDVVGELTKAMERIG-LDMRVSAALYNDTVGTLGGRY-YNDVVAAYILGTGTNAAYVERAQSIPKWH-GL--  
*M. musculus* FPCQSKIDEAVLITHTKRFKASGVGADVVKLLNKAIKKRGDYDANIYAVVNDTVGTHMTCGY-DDQCEVGLIIGTGTNACYMEELRHIDLVE-----  
*H. sapiens* FPCQSKIDEAVLITHTKRFKASGVGADVVKLLNKAIKKRGDYDANIYAVVNDTVGTHMTCGY-DDQCEVGLIIGTGTNACYMEELRHIDLVE-----  
%pv.Q.si.sg.li.WTKgF....a.G.DvV..l..a..r.g..d.r!.AlvNDT!Gt\$a.g.%..d....gvI.GTGtNaa%v#.a..i.ku.....

**Figure S2. Position of threonine 231 in HXK1 primary protein sequences**

Protein sequences of indicated species were collected on public resources (www.ncbi.nlm.nih.gov), and multiple alignment was performed with the online software Multalin (multalin.toulouse.inra.fr/multalin). The arrow indicates the threonine 231.

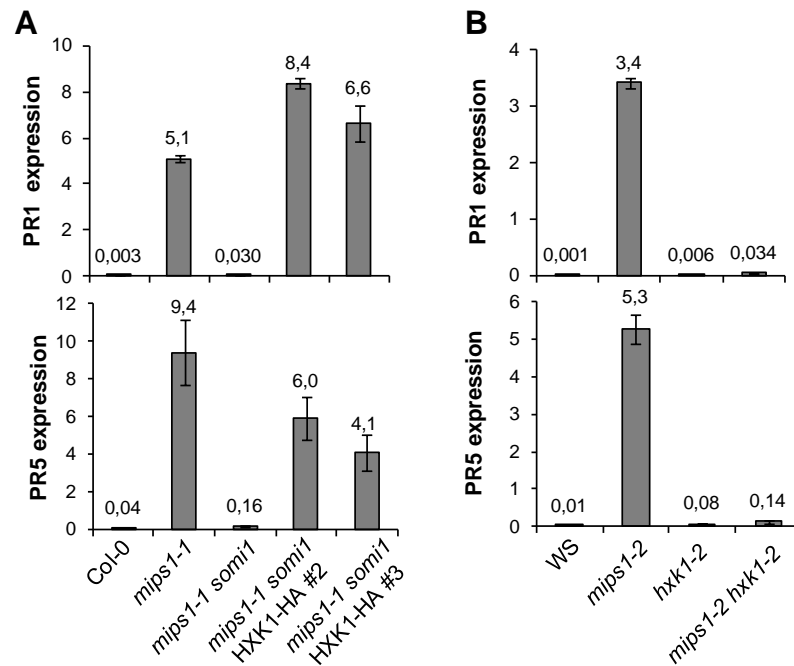
This assumption is further substantiated by the fact that loss of only one functional *MIPS2* allele is sufficient to restore lesion formation in *mips1 hxx1* mutants, indicating that fine-tuning of *MIPS2* expression plays an important role in PCD control.

## DISCUSSION

Due to their sessile nature, plants are confronted continuously to adverse conditions due to both abiotic and biotic stress. PCD is a vital component of plant immunity, although the molecular mechanisms that control it remain poorly understood. To identify novel regulators of plant PCD, we used a genetic approach and found that the hexokinase HXK1 is required for lesion formation in the *mips1* mutant via SA-dependant signalling. Our work revealed that lesions triggered by a decrease in MI content can be genetically reverted in the double mutant *mips1 hxx1* and re-induced by complementation with HXK1.

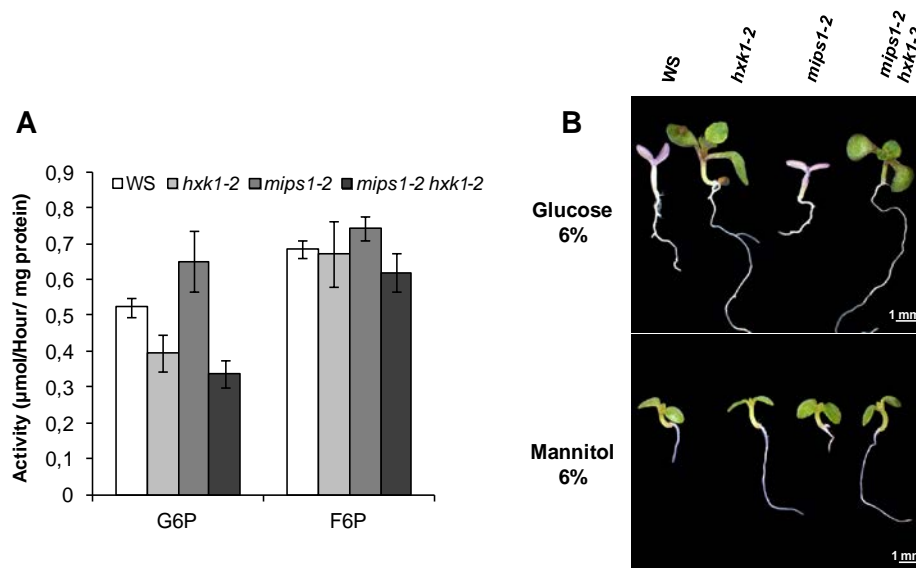
As demonstrated by cellular ion leakage and trypan blue staining analysis, both of which measure cell death, *hxx1* is epistatic over the *mips1* mutation. The mechanisms linking carbohydrate metabolism with defence responses, including PCD, are beginning to be elucidated (Rojas *et al.*, 2014). Analyses of Pathogenesis Related (PR) genes induction in tobacco leaf disks and in *Arabidopsis* liquid cultures in response to soluble sugars, suggest a positive regulatory function of HXK1 (Herbers *et al.*, 1996; Xiao *et al.*, 2000). However, in *Nicotiana benthamiana*, down regulation of HXK1 by virus-induced gene silencing (VIGS) caused an increased cell death (Kim *et al.*, 2006), revealing that HXK1 can also function as a negative regulator of defence responses. Although the molecular events connecting the reduced MI content with changes in HXK1 activity remain to be elucidated, one simple explanation for the suppression of lesions in *mips1 hxx1* mutants would be that MI levels affect the transcriptional regulation of *HXK1*, leading to its over-expression in the *mips1* background and, subsequently, the constitutive activation of defence genes and PCD via unknown mechanisms. However, quantitative RT-PCR did not detect an over-accumulation of the *HXK1* transcripts in both alleles of *mips1*, which rules out this hypothesis.

Using catalytically inactive HXK1 mutants, we demonstrated that the glucose phosphorylation activity is necessary for the suppression of cell death. Although this result does not exclude the involvement of HXK1 signalling functions in the cell death suppression, it demonstrates that a metabolic deregulation is necessary. Similarly, in the lesion mimic mutant *cpr5*, displaying phenotypes related to glucose signalling and defence responses (Yoshida *et al.*, 2002), lesion formation and constitutive SA production were found to be independent of HXK1-mediated glucose signalling (Aki *et al.*, 2007).



**Figure S3. Relative expression of *PR1* and *PR5***

A and B, RT-qPCR analysis of *PR1* and *PR5* expression in rosette leaves from indicated genotypes, 4 days after transfer in LD conditions. Transcript abundance is expressed relative to *UBQ10* transcripts abundance.



**Figure S4. HXK1 metabolic and signalling functions in the mutants *hxx1-2* and *mips1-2 hxx1-2***

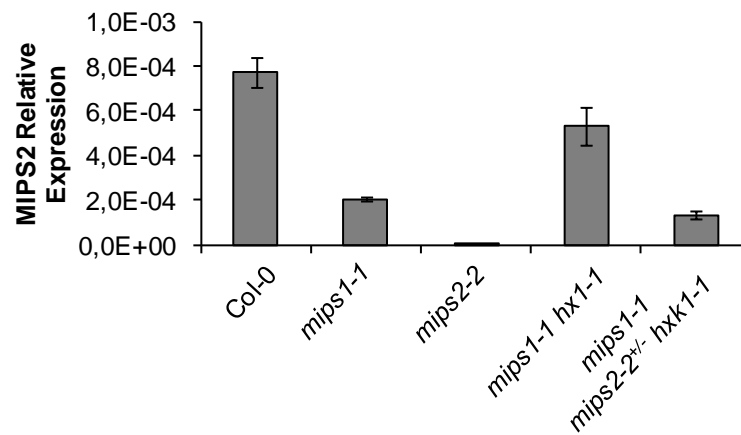
A, Glucokinase and fructokinase activity measurement in the indicated lines. G6P: Glucose-6-phosphate; F6P: Fructose-6-phosphate. Samples were harvested two days after transfer in LD conditions, and means and standard error were calculated from four biological replicates. B, Glucose sensitivity assay. Plants were grown on 1/2 MS medium supplemented with 6% glucose (Glc) or mannitol (Man), for 10 days.

Metabolomics analysis further revealed a restoration of the MI content in *mips1 hxx1* mutants. This result is consistent with our previous results showing that spraying plants with MI is enough to suppress lesion formation, indicating that inositol production, and not the MIPS1 protein itself, is required to prevent PCD in leaves. MI was even more over-accumulated in mutants deficient for HXX1 compared to the wild type, suggesting that normal HXX activity is required to down-regulate the activity of enzymes involved in MI biosynthesis. Consistently, it has been shown that transgenic tomato plants overexpressing Arabidopsis *HXX1* exhibit lower inositol accumulation in their fruits (Roessner-Tunali *et al.*, 2003).

The over accumulation of MI in the *hxx1* mutant background may seem surprising since hexokinase enzymes catalyse the formation of G6P, the immediate substrate of MIPS enzymes. However, hexokinase activity assays revealed only a slight decrease of G6P formation in the different *hxx1* backgrounds, indicating that G6P levels are probably not drastically reduced in *hxx1* mutants. Residual G6P formation is likely dependent on the activity of other endogenous hexokinases that may have important roles in glucose metabolism and may account for the HXX1 alteration being nonlethal as already noted by Moore *et al.*, (2003).

Using combination of lines mutated in other *MIPS* gene, we demonstrated that restored MI biosynthesis in *mips1 hxx1* required MIPS2 while MIPS3 was not involved. As a highly conserved enzyme, MIPS protein was found in all eukaryotes and a few prokaryotes. In the phylogenetic tree constructed with more than 100 eukaryotic MIPS protein sequences, MIPS from plants form an independent subgroup and multiple copies of the MIPS gene emerge only in land plant species (Luo *et al.*, 2011). All three genes are functional and were able to rescue the Yeast inositol auxotrophy mutant *ino1* (Luo *et al.*, 2011), moreover, the corresponding proteins share about 90% identity at the amino acid level. Thus the evolution of these small multigenic families likely represents diversification of temporal and spatial regulation rather than changes in amino acid sequences or catalytic capacity. Using RT-PCR analysis, we only detected a mild activation of *MIPS2* expression in *mips1 hxx1* genetics background, and only after plants were transferred two LD. However, while *MIPS1* is expressed in cells throughout tissues such as leaves, *MIPS2* expression is confined to vascular or vascular-associated cells (Donahue *et al.*, 2010), and maybe subtle changes in its spatial expression could be more efficiently detected only by *in situ* analyses. It could also suggest that the rescue of MI content by MIPS2 is due to a translational or post-translational control. However, such regulation will be challenging to demonstrate requiring to discriminate, *in vivo*, between enzymatic activities of the different MIPS isoforms. Moreover, it is still unclear why MIPS2 is able to rescue *mips1* cell death phenotype, by a MI production, only in the context of the *mips1 hxx1* background and not in the single *mips1* mutant. According to our





**Figure S5. Effect of the *hvk1-1* mutation on the expression of *MIPS2*.**

RT-qPCR analysis of *MIPS2* expression in rosette leaves from indicated genotypes, 4 days after transfer in LD conditions. Transcript abundance is expressed relative to *UBQ10* transcripts abundance.

expression analysis, *MIPS2* expression seems to be repressed when *mips1* mutants are transferred to cell death-inducing conditions, and this down-regulation appears to be partially alleviated by the *hxx1* mutation. Interestingly, loss of a single *MIPS2* allele was sufficient to restore lesion formation in *mips1 hxx1* mutants, indicating that tight regulation of *MIPS2* expression level is crucial for the control of MI-dependent PCD. How much this regulation contributes to PCD onset remains to be fully established, but one can hypothesise that a control of *MIPS2* activity by primary carbohydrate metabolism is a key component of MI-dependent PCD, and that this pathway involves hexokinase enzymes, as energy provider or source of signalling molecules. Several studies have already suggested, that plants have the ability to modulate their sugar pools to act as putative agents of immune reactions (Bolouri Moghaddam and Van den Ende, 2012).

It is also worth noting that *hxx1* suppresses the autoimmune response but not the root and cotyledon developmental defects of *mips1*, indicating that these pathways can be uncoupled. It confirms our previous work (Bruggeman *et al.*, 2014), showing that although lesion formation was totally abolished in the *mips1 oxt6* double mutant, defects in root elongation were still presents and that rescue of the cotyledon phenotype was only partial suggesting that these two developmental pathways are totally or only partly dependent on the spontaneous cell death phenotype. This observation also further supports the notion that HXK-dependent regulation of *MIPS2* expression, according to growth conditions, is a key component of MI-dependent PCD regulation. In the context of *mips1 hxx1* double mutant, displaying a restoration of the global MI content, one can hypothesise of a difference in MI compartmentalization or of a time lag of the MI production during seedling development explaining the non rescue of root and cotyledon defects by *hxx1* mutation.

In conclusions, our work defines an example of HXK1-mediated cell death in plant requiring catalytic activity of the enzyme. Genetics analysis demonstrated that it is not directly due to the function of HXK1 itself but to a cooperative action of two MIPS isoforms, *MIPS2* being responsible of the MI synthesis in the *mips1 hxx1* background. The sessile nature of plants forces them to face an ever-changing environment instead of escape from hostile conditions as animals do. In order to overcome this survival challenge, a fine monitoring and controlling of the status of the general metabolism, which MI biosynthesis is part, is vital for these organisms. Frequently, evolutionary plant adaptation has consisted in the appearance of multigenic families, comprising an array of enzymes, or sensing and signaling elements with highly conserved primary sequences but with differential spatio-temporal regulation. The demonstration of cooperative action of two MIPS enzyme under particular metabolic status highlights a new checkpoint of MI homeostasis in plant.

**RT-qPCR primers**

Primer name	DNA sequence (5' to 3')
HXK1qPCR-fwd	GCTCTGGAAAGAGTTGGTCTTG
HXK1qPCR-rev	TATCTACCACCGGCTAGTGTTC
MIPS1qPCR-fwd	CAAATCCGAGGGAGAGGAAAGTTTC
MIPS1qPCR-rev	TGCGTTAATCACCGGAGTTCCC
MIPS2qPCR-fwd	TAAAGCTGAAGGAGAGGGAAGTTTC
MIPS2qPCR-rev	AGGTACCTTTACTTCTTCTCCTCATGC
MIPS3qPCR-fwd	CATGAGTGAAAGGAGGGAAAGTTTC
MIPS3qPCR-rev	ACAAAGCATTAACTGCGCTG
PR1-Fwd	ACTACAACCTACGCTGCGAACAC
PR1-rev	TCACCTTTGGCACATCCGAGTC
PR5-fwd	TGTCGTGGCCTGCAAGAGTG
PR5-rev	AGTCCGTGGGAGGACAAGTTTC
UBQ10-fwd	GGCCTTGATAATCCCTGATGAATAAG
UBQ10-rev	AAAGAGATAACAGGAACGGAACATAGT

**Cloning primers**

Primer name	DNA sequence (5' to 3')
29100BamHIATG	CGCGGATCCATGAATAGAGGTGTGTTGGAG
29100XhoIend	TTGGCTCCGCCGTTTCCACTCGAGCGG
29130BamHIATG	CGCGGATCCATGGGTAAAGTAGCTGTTGGA
29130XhoIend	CCGCTCGAGGAGTCTTCAAGGTAGAGAGA

**Primers for targeted mutagenesis**

Primer name	DNA sequence (5' to 3')	Amino acid Change
HXK1-G104D-fwd	GCATTGGACCTAGGGGATACAACTTCCGTGTC	Gly104Asp
HXK1-G104D-rev	GACACGGAAGTTTGTATCCCTAGGTCCAATGC	
HXK1-S177A-fwd	GAATTAGGTTTCACTTTCGCGTTTCTGTTAAGCAG	Ser177Ala
HXK1-S177A-rev	CTGCTTAACAGGAAACGCGAAAGTGAAACCTAATTC	

**Genotyping primers**

Primer name	DNA sequence (5' to 3')
At4g24610-caps-fwd	GAAGGATGGTTTTTCGTCCA
At4g24610-caps-rev	GAGGGGTAGCCAGATAGCAA
At4g25320-caps-fwd	AACACAACAAATGCGGTTCA
At4g25320-caps-rev	CCGCTCGAGCTCGGAATCTCGTTGTCAGA
At4g29100-caps-fwd	CGTTGCCACCACATGACT
At4g29100-caps-rev	CAAGATCATGTCATGTGCGTA
HXK1-2-fwd	ATGATTGGTGCTACCAGAACTTAG
HXK1-2-rev	CTCCAACAGCTACTTTACCCATTTT
HXK1-caps-fwd	TTGGTCTTGACATGCGAATC
HXK1-caps-rev	ACCTGAAGTTTCCCATTC
Lba1	TGGTTCACGTAGTGGCCATCG
MIPS1-LP	TTGCTAGCAACCATATCGTCC
MIPS1-RP	TTCGTGTCGATCTTTTAACG
MIPS1-2-fwd	ACTCACACCCAAAACCGATCCA
MIPS2-2-LP	ATGGATCAACACTAACCCTG
MIPS2-2-RP	CTCACAATCGAAGTAGGCTGC
MIPS3-2-LP	AAGTCATCACCACCGATCAAG
MIPS3-2-RP	ATTTCCGGTCATTAAACCAAG
Tag3	TGATACCAGACGTTGCCCGCATAA
Tag5	CTACAAATTGCCTTTCTTATCGAC

**Couple of primers used for genotyping**

T-DNA line	WT allele	mutant allele
<i>hvk1-2</i>	HXK1-2-fwd + HXK1-2-rev	HXK1-2-rev + Tag5
<i>mips1-1</i>	MIPS1-LP + MIPS1-RP	MIPS1-RP + Lba1
<i>mips1-2</i>	MIPS1-LP + MIPS1-2-fwd	MIPS1-RP + Tag3
<i>mips2-2</i>	MIPS2-2-LP + MIPS2-2-RP	MIPS2-2-RP + Lba1
<i>mips3-2</i>	MIPS3-2-LP + MIPS1-RP	MIPS1-RP + Lba1

**Couples of primers for CAPS identification**

Gene	CAPS PCR	Digestion enzyme
At4g24610	At4g24610-caps-fwd + At4g24610-caps-rev	HindIII
At5g25320	At4g25320-caps-fwd + At4g25320-caps-rev	Tag1
Atg29100	At4g29100-caps-fwd + At4g29100-caps-rev	Alu1
HXK1	HXK1-caps-fwd + HXK1-caps-rev	EcoRV

**Table S1. List of primers used in this study.**

## METHODS

### Plants material and growth conditions

The T-DNA lines *mips1-1* (SALK\_023626), *mips2-2* (SALK\_031685) and *mips3-2* (SALK\_120131) mutants were in the Columbia-0 (Col-0) background. The *hxl1-2* (Flag346H03) and *mips1-2* (Flag605F08) mutants were in the Wassilewskija (Ws) background. All these T-DNA lines were obtained from public seeds banks (Samson *et al.*, 2002, Alonso *et al.*, 2003). All double mutants and triple mutants were obtained by crossing and genotyped with appropriate primers listed in Table S1.

For primary root length and cotyledon analysis, seeds were sown on commercially available 0.5X Murashige and Skoog medium (Basalt Salt Mixture M0221, Duchefa) solidified with 0.8% agar (Phyto-Agar HP696, Kalys) and grown in a long-day (16 h light, 8 h night, 20°C) growth chamber. For glucose sensing assays, seeds were sown on solid 0.5X MS medium supplemented with 6% (w/v) of glucose or mannitol and seedlings were grown for 10 days.

For all other analysis, plants were grown one week as described above and transferred to soil under SD conditions (8h day, 16h night, 200µmol photons/s/m<sup>2</sup>, 21°C) for two weeks. Plants were subsequently transferred to LD conditions (16h day, 8h night, 200µmol photons.s<sup>-1</sup>.m<sup>-2</sup>, 21°C) for the indicated time.

### Screen and mapping of the *somil* mutation

About 20 000 *mips1-1* homozygous seeds were incubated for 4 hours in 0.74% (w/v) EMS. *somil* mutants were screened in M<sub>2</sub> generation in restrictive conditions.

To map the *somil* mutation, *mips1-1 somil* plants in the Col-0 background, were crossed with an allelic mutant of *mips1-1*, the *mips1-2* mutant, in the WS background. First, a Bulk Segregant Analysis (BSA) was performed using F2 plants without (n=22) or with lesions (n=22) in LD. Primer sequences that flank polymorphism markers between Col-0 and WS are described by (Pacurar *et al.*, 2012). Second, fine mapping of the mutation *somil* was performed by a high throughput sequencing of nuclear DNA obtained from a bulk of 156 F2 plants without lesions in LD. Whole Arabidopsis genome re-sequencing were performed by the company Macrogen (10F, 254 Beotkkot-ro Geumcheon-gu, Seoul, Rep. of Korea) using the Illumina HiSeq2000<sup>®</sup> technology. The software CLC genomic workbench<sup>®</sup> ([www.clcbio.com](http://www.clcbio.com)) was used to analyze sequence and identify single-nucleotide polymorphism (SNP) by comparison with the Col-0 genome as reference (TAIR10). After two backcrosses of *mips1-1 somil* with *mips1-1* single mutant to clean background mutations, Cleaved Amplified Polymorphic Sequences (CAPS) markers were used on 30 *mips1-1 somil* plants to removed SNP mutations not linked to the *somil* locus. Primer sequences and restriction enzymes used are listed in Table S1.

### Cloning methods

cDNA sequences of HXK1 (At4g29130) and At4g29100 were amplified from the clones G21654 and U16338, respectively, available in public bank (<http://www.arabidopsis.org>). Primer listed in Table S1



were used to amplify corresponding cDNA and to remove stop codons. cDNAs were cloned into the Gateway compatible pEntr3C vector (Invitrogen) and transferred into the binary vector pGWB14 (Nakagawa *et al.*, 2007) using the LR clonase (Invitrogen) according to manufacturer's instructions. In this plasmid, the expression of cDNA is under the control of the 35S promoter and encoded proteins are fused with three hemagglutinin (HA) tags.

To generate the two catalytically inactive HXK1 alleles, G104D and S177A, we performed a targeted mutagenesis of the HXK1 cDNA. Wild-type cDNA sequence in the plasmid pENTR3C, previously obtained, was used as template for PCR amplification with primers listed in Table S1. These oligonucleotides create nucleotide substitutions to induce amino acids change. The mutagenized cDNAs were then cloned into the pGWB14 vector as previously described.

### **Cell death assays: electrolyte loss and trypan blue staining**

For electrolyte loss, leaf disks were removed with a 5 mm punch and floated on distilled water for 10 min. Six leaf disks per genotype were transferred to a tube containing 2 ml of distilled water and agitated for 2 hours. Conductivity ( $\mu\text{S}/\text{cm}^2$ ) was then measured with the CDM 210 conductivity meter (Radiometer analytical). Means and standard deviation were from 4 replicates per genotype per experiment.

For trypan blue staining, rosette leaves were infiltrated 3 times under vacuum with lactophenol trypan solution (trypan blue 2.5 mg/mL, 25% lactic acid, 23% water saturated phenol, 25% glycerol and  $\text{H}_2\text{O}$ ). Samples were then washed with distilled water, and heated over boiling water. After cooling, samples were cleared with a chloral hydrate solution (8g of chloral hydrate were dissolved in 2ml of glycerol 50 % and 1ml of water); the solution was replaced several times. Samples were mounted in chloral hydrate solution and observed with a macroscope (Nikon AZ100 Multizoom).

### **Salicylic acid quantification**

Wild-type and mutant plants were grown under SD conditions for three weeks, and subsequently transferred to LD conditions. About 100 mg of leaves were harvested just before transfer in LD (SD condition), and after four days after transfer to LD conditions. Metabolites were extracted as described by Baillieul *et al.* (1995) with the following modifications. [ $\text{C}^{14}$ ] SA was added to each sample for extraction loss correction. Samples were dried in a Speed-Vac (Savant Instrument Inc., New York, NY, USA). One half of dried samples were directly used to analyse free SA. The other dried samples were subjected to acidic hydrolysis in order to determine total SA (free plus conjugated forms). HPLC analyses were performed according to Simon *et al.* (2010) using the Waters system previously described. Peak purity determination and extraction loss correction were performed as previously mentioned. Absolute SA quantification was obtained using a standard curve made with SA standards. Data were analysed using Empower Pro Software (Waters corporation, Milford, U.S.A). Corrections for losses were done as described previously by Baillieul *et al.* (1995) using a LS 6500 Multi-Purpose Scintillation Counter



(Beckman Coulter, Fullerton, U.S.A). Data presented here are the average of results obtained from four biological replicates.

### **RNA extraction and RT-qPCR**

Total RNA was extracted from rosette leaves four days after transfer in LD conditions, using the Nucleospin RNA kit (Macherey- Nagel) according to the manufacturer's instructions. First-strand cDNA was synthesized from 2 µg of total RNA using Improm-II reverse transcriptase (A3802, Promega) according to the manufacturer's instructions. 1/25th of the synthesized cDNA was mixed with 100nM solution of each primer and LightCycler® 480 Sybr Green I master mix (Roche Applied Science) for quantitative PCR analysis. Products were amplified and fluorescent signals acquired with a LightCycler® 480 detection system. The specificity of amplification products was determined by melting curves. AtUBQ10 was used as internal control for signal normalization. Exor4 relative quantification software (Roche Applied Science) automatically calculates relative expression level of the selected genes with algorithms based on  $\Delta\Delta C_t$  method. Data were from duplicates of at least two biological replicates. Primers used are described in Table S1.

### **Metabolites extraction and GC-MS analysis**

Analytical procedures were adapted from Roessner *et al.* (2000).

About 100 mg of rosette leaves of the indicated lines were harvested four days after transfer in LD conditions. Samples were lyophilised, ground and metabolites were extracted by adding 500µl of cold methanol, containing 250µM of ribitol as internal standard. Extracts were then warmed at 70°C for 15min and vortexed regularly. 500µl of chlorophorm was added and samples were vortexed and incubated at 37°C for 5min. Then, 450µl of ultrapure water, containing 250µM of ribitol, was added on extracts that were centrifugated for 5min at 13 200g, at 4°C, to separate phases. The upper phase was collected (600µl) and 50µl of these supernatant was evaporated over-night under vacuum.

#### *Sample derivatization*

50µL of a pyridine solution was added, containing 20mg/mL of methoxyamine hydrochloride and 5µL/mL of a 2mg/mL n-alkanes mixture (retention index standards : decane, dodecane, pentadecane, octadecane, nonadecane, docosane, octacosane, dotriacontane and hexatriacontane). The tubes were sealed and heated up to 40°C for 90 min. Then 80µL of N,O-bis(triméthylsilyl)trifluoroacétamide was added for silylation to perform during 30 min at 40°C.

#### *GC-MS analysis*

Analyses were performed by gas chromatography (Agilent 6890) and quadrupole mass spectrometry with electron impact ionization (Agilent 5973 Network). A volume of 1µL was injected on a Agilent J&W HP-5ms column (diameter : 0.25mm, film thickness : 0.25µm, length : 30m) with a 0.6mL/min helium flow. The injection parameters were : splitless injection at 230°C with a 1 min purge at 20mL/min. The temperature gradient was : 1min at 70°C ; 9°C min until 320°C then 10 min at 320°C, and the solvent





delay was 5.4 min. The source was set to 250°C and 70eV, scanning at 20 scans/min, from 70 to 600 m/z. Acquisition was performed with the Chemstation software (Agilent, Santa Clara, USA).

#### *Data treatment*

Semi-automated integration of chromatograms was performed with the Quanlynx software (Waters, Milford, USA) after conversion of the raw data into NetCDF format. A model ion was chosen manually to perform a correct integration for 138 peaks, with the following criterions : Gaussian shape, high relative abundance in the mass spectrum and absence of saturation in any sample. Three very abundant compounds however gave saturated signal for any ion : sucrose, citrate and malate ; the samples were thus re-injected in split mode (1:30) to integrate these compounds. Metabolites were annotated according to the Chemical Analysis Working Group (Sumner *et al.*, 2007) : 41 metabolites identified thanks to pure reference standards, 34 putatively annotated compounds on the basis of both spectral and retention index matches with public database (The Golm Metabolome Databases, (Kopka *et al.*, 2005), 41 compounds related to known compounds or chemical classes on the unique basis of spectral match, and 10 unknown analytes. Peak surfaces were then normalized according to internal standard peak surface (ribitol) and sample fresh weight, to obtain semi-quantitative data. Data presented here are the average of the results obtained from four biological replicates.

#### **Hexokinase activity assay**

Wild-type, mutants and transgenic plants were grown under SD conditions for three weeks, and subsequently transferred to LD conditions. At least 200mg of rosette leaves were harvested two days after transfer in LD. Frozen were ground in liquid nitrogen and resuspended with 2ml of the extraction buffer (50mM Bicine – NaOH buffer (pH 8,5), 5mM MgCl<sub>2</sub>, 0,1% (v/v) Triton X-100, few microliters of a protease inhibitor cocktail). The extracts were centrifugated for 5min at 10 000 rpm at 4°C and supernatant were desalted with PD10 columns (GE healthcare). The extracts were eluted from column with 3,5ml of elution buffer (similar to extraction buffer without triton). The desalted extracts were directly used for protein quantification or activity assays. For glucokinase activity measurement, desalted extracts were mixed with the glucose reaction buffer [50mM Bicine – NaOH buffer (pH 8,5), 5mM MgCl<sub>2</sub>, 1mM NADP, 2,5mM ATP, 2mM Glucose and 1Unit/ml of G6PDH enzyme (Roche)] in a 1mL cuvette and absorbance at 340nm was measured continuously for 30min with a spectrophotometer. For fructokinase activity assay, desalted extracts were mixed with the fructose reaction buffer [50mM Bicine – NaOH buffer (pH 8,5), 5mM MgCl<sub>2</sub>, 1mM NADP, 2,5mM ATP, 2mM fructose , 1Unit/ml of G6PDH, and 2Units/ml of PGI enzyme (Roche)] and measurements were performed as for the glucokinase activity. Data presented here are the average of the results obtained from four biological replicates.

#### **ACKNOWLEDGMENTS**



We are grateful to S. Merlot (ISV, CNRS, Gif/Yvette) for assistance with bio-informatic and sequences analyses. We thank T. Messier and Q. Hocheux for assistance during phenotypical characterization.

## REFERENCES

- Aki, T., Konishi, M., Kikuchi, T., Fujimori, T., Yoneyama, T., and Yanagisawa, S.** (2007). Distinct modulations of the hexokinase1-mediated glucose response and hexokinase1-independent processes by HYS1/CPR5 in Arabidopsis. *Journal of experimental botany* **58**, 3239-3248.
- Alcazar-Roman, A.R., and Wente, S.R.** (2008). Inositol polyphosphates: a new frontier for regulating gene expression. *Chromosoma* **117**, 1-13.
- Baillieul, F., Genetet, I., Kopp, M., Saindrenan, P., Fritig, B., and Kauffmann, S.** (1995). A new elicitor of the hypersensitive response in tobacco: a fungal glycoprotein elicits cell death, expression of defence genes, production of salicylic acid, and induction of systemic acquired resistance. *The Plant journal : for cell and molecular biology* **8**, 551-560.
- Berkey, R., Bendigeri, D., and Xiao, S.** (2012). Sphingolipids and plant defense/disease: the "death" connection and beyond. *Frontiers in plant science* **3**, 68.
- Bolouri Moghaddam, M.R., and Van den Ende, W.** (2012). Sugars and plant innate immunity. *Journal of experimental botany* **63**, 3989-3998.
- Bruggeman, Q., Garmier, M., de Bont, L., Soubigou-Taconnat, L., Mazubert, C., Benhamed, M., Raynaud, C., Bergounioux, C., and Delarue, M.** (2014). The Polyadenylation Factor Subunit CLEAVAGE AND POLYADENYLATION SPECIFICITY FACTOR30: A Key Factor of Programmed Cell Death and a Regulator of Immunity in Arabidopsis. *Plant physiology* **165**, 732-746.
- Chaouch, S., and Noctor, G.** (2010). Myo-inositol abolishes salicylic acid-dependent cell death and pathogen defence responses triggered by peroxisomal hydrogen peroxide. *The New phytologist* **188**, 711-718.
- Chen, H., and Xiong, L.** (2010). myo-Inositol-1-phosphate synthase is required for polar auxin transport and organ development. *The Journal of biological chemistry* **285**, 24238-24247.
- Conklin, P.L., Gatzek, S., Wheeler, G.L., Dowdle, J., Raymond, M.J., Rolinski, S., Isupov, M., Littlechild, J.A., and Smirnov, N.** (2006). Arabidopsis thaliana VTC4 encodes L-galactose-1-P phosphatase, a plant ascorbic acid biosynthetic enzyme. *The Journal of biological chemistry* **281**, 15662-15670.
- den Ende, W.V.** (2013). Multifunctional fructans and raffinose family oligosaccharides. *Frontiers in plant science* **4**, 247.
- Donahue, J.L., Alford, S.R., Torabinejad, J., Kerwin, R.E., Nourbakhsh, A., Ray, W.K., Hernick, M., Huang, X., Lyons, B.M., Hein, P.P., and Gillasp, G.E.** (2010). The Arabidopsis thaliana Myo-inositol 1-phosphate synthase1 gene is required for Myo-inositol synthesis and suppression of cell death. *The Plant cell* **22**, 888-903.
- Eisenberg, F., Bolden, A.H., and Loewus, F.A.** (1964). Inositol formation by cyclization of glucose chain in rat testis. *Biochemical and biophysical research communications* **14**, 419-424.
- GhoshDastidar, K., Chatterjee, A., Chatterjee, A., and Majumder, A.L.** (2006). Evolutionary divergence of L-myo-inositol 1-phosphate synthase: significance of a "core catalytic structure". *Sub-cellular biochemistry* **39**, 315-340.
- Gillasp, G.E.** (2011). The cellular language of myo-inositol signaling. *The New phytologist* **192**, 823-839.
- Gillasp, G.E.** (2013). The role of phosphoinositides and inositol phosphates in plant cell signaling. *Advances in experimental medicine and biology* **991**, 141-157.
- Granot, D., Kelly, G., Stein, O., and David-Schwartz, R.** (2014). Substantial roles of hexokinase and fructokinase in the effects of sugars on plant physiology and development. *Journal of experimental botany* **65**, 809-819.

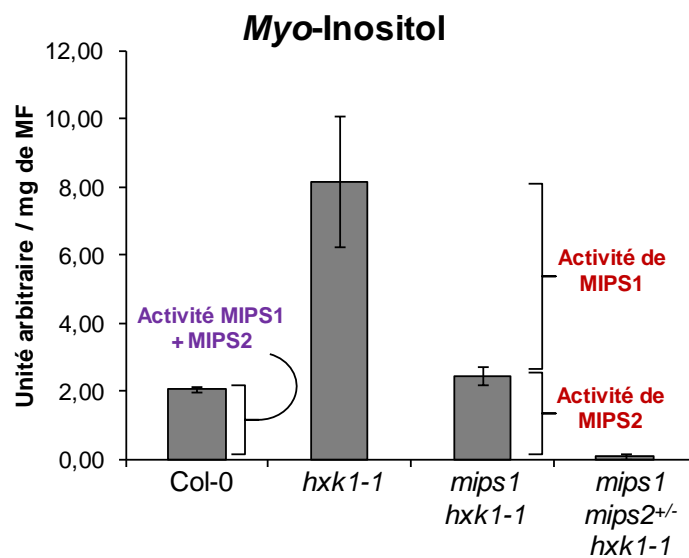


- Herbers, K., Meuwly, P., Metraux, J.P., and Sonnewald, U.** (1996). Salicylic acid-independent induction of pathogenesis-related protein transcripts by sugars is dependent on leaf developmental stage. *FEBS letters* **397**, 239-244.
- Jang, J.C., Leon, P., Zhou, L., and Sheen, J.** (1997). Hexokinase as a sugar sensor in higher plants. *The Plant cell* **9**, 5-19.
- Johnson, M.D., and Sussex, I.M.** (1995). 1 L-myo-Inositol 1-Phosphate Synthase from *Arabidopsis thaliana*. *Plant physiology* **107**, 613-619.
- Kim, M., Lim, J.H., Ahn, C.S., Park, K., Kim, G.T., Kim, W.T., and Pai, H.S.** (2006). Mitochondria-associated hexokinases play a role in the control of programmed cell death in *Nicotiana benthamiana*. *The Plant cell* **18**, 2341-2355.
- Kopka, J., Schauer, N., Krueger, S., Birkemeyer, C., Usadel, B., Bergmüller, E., Dormann, P., Weckwerth, W., Gibon, Y., Stitt, M., Willmitzer, L., Fernie, A.R., and Steinhauser, D.** (2005). GMD@CSB.DB: the Golm Metabolome Database. *Bioinformatics (Oxford, England)* **21**, 1635-1638.
- Kraakman, L.S., Winderickx, J., Thevelein, J.M., and De Winder, J.H.** (1999). Structure-function analysis of yeast hexokinase: structural requirements for triggering cAMP signalling and catabolite repression. *The Biochemical journal* **343 Pt 1**, 159-168.
- Latrasse, D., Jegu, T., Meng, P.H., Mazubert, C., Hudik, E., Delarue, M., Charon, C., Crespi, M., Hirt, H., Raynaud, C., Bergounioux, C., and Benhamed, M.** (2013). Dual function of MIPS1 as a metabolic enzyme and transcriptional regulator. *Nucleic acids research* **41**, 2907-2917.
- Liang, H., Yao, N., Song, J.T., Luo, S., Lu, H., and Greenberg, J.T.** (2003). Ceramides modulate programmed cell death in plants. *Genes & development* **17**, 2636-2641.
- Loewus, F.A., and Murthy, P.P.N.**
- Loewus, F.A., and Murthy, P.P.N.** (2000). myo-Inositol metabolism in plants. *Plant Sciences* **150**, 1-19.
- Lorence, A., Chevone, B.I., Mendes, P., and Nessler, C.L.** (2004). myo-inositol oxygenase offers a possible entry point into plant ascorbate biosynthesis. *Plant physiology* **134**, 1200-1205.
- Luo, Y., Qin, G., Zhang, J., Liang, Y., Song, Y., Zhao, M., Tsuge, T., Aoyama, T., Liu, J., Gu, H., and Qu, L.J.** (2011). D-myo-inositol-3-phosphate affects phosphatidylinositol-mediated endomembrane function in *Arabidopsis* and is essential for auxin-regulated embryogenesis. *The Plant cell* **23**, 1352-1372.
- Ma, H., Bloom, L.M., Zhu, Z.M., Walsh, C.T., and Botstein, D.** (1989). Isolation and characterization of mutations in the HXK2 gene of *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular and cellular biology* **9**, 5630-5642.
- Meng, P.H., Raynaud, C., Tcherkez, G., Blanchet, S., Massoud, K., Domenichini, S., Henry, Y., Soubigou-Taconnat, L., Lelarge-Trouverie, C., Saindrenan, P., Renou, J.P., and Bergounioux, C.** (2009). Crosstalks between myo-inositol metabolism, programmed cell death and basal immunity in *Arabidopsis*. *PloS one* **4**, e7364.
- Michell, R.H.** (2008). Inositol derivatives: evolution and functions. *Nature reviews. Molecular cell biology* **9**, 151-161.
- Mitsuhashi, N., Kondo, M., Nakaune, S., Ohnishi, M., Hayashi, M., Hara-Nishimura, I., Richardson, A., Fukaki, H., Nishimura, M., and Mimura, T.** (2008). Localization of myo-inositol-1-phosphate synthase to the endosperm in developing seeds of *Arabidopsis*. *Journal of experimental botany* **59**, 3069-3076.
- Moore, B., Zhou, L., Rolland, F., Hall, Q., Cheng, W.H., Liu, Y.X., Hwang, I., Jones, T., and Sheen, J.** (2003). Role of the *Arabidopsis* glucose sensor HXK1 in nutrient, light, and hormonal signaling. *Science (New York, N.Y.)* **300**, 332-336.
- Nakagawa, T., Kurose, T., Hino, T., Tanaka, K., Kawamukai, M., Niwa, Y., Toyooka, K., Matsuoka, K., Jinbo, T., and Kimura, T.** (2007). Development of series of gateway binary vectors, pGWBs, for realizing efficient construction of fusion genes for plant transformation. *Journal of bioscience and bioengineering* **104**, 34-41.
- Pacurar, D.I., Pacurar, M.L., Street, N., Bussell, J.D., Pop, T.I., Gutierrez, L., and Bellini, C.** (2012). A collection of INDEL markers for map-based cloning in seven *Arabidopsis* accessions. *Journal of experimental botany* **63**, 2491-2501.



- Radzio, J.A., Lorence, A., Chevone, B.I., and Nessler, C.L.** (2003). L-Gulonolactone oxidase expression rescues vitamin C-deficient Arabidopsis (vtc) mutants. *Plant molecular biology* **53**, 837-844.
- Roessner, U., Wagner, C., Kopka, J., Trethewey, R.N., and Willmitzer, L.** (2000). Technical advance: simultaneous analysis of metabolites in potato tuber by gas chromatography-mass spectrometry. *The Plant journal : for cell and molecular biology* **23**, 131-142.
- Roessner-Tunali, U., Hegemann, B., Lytovchenko, A., Carrari, F., Bruedigam, C., Granot, D., and Fernie, A.R.** (2003). Metabolic profiling of transgenic tomato plants overexpressing hexokinase reveals that the influence of hexose phosphorylation diminishes during fruit development. *Plant physiology* **133**, 84-99.
- Rojas, C.M., Senthil-Kumar, M., Tzin, V., and Mysore, K.S.** (2014). Regulation of primary plant metabolism during plant-pathogen interactions and its contribution to plant defense. *Frontiers in plant science* **5**, 17.
- Rolland, F., Baena-Gonzalez, E., and Sheen, J.** (2006). Sugar sensing and signaling in plants: conserved and novel mechanisms. *Annual review of plant biology* **57**, 675-709.
- Samson, F., Brunaud, V., Balzergue, S., Dubreucq, B., Lepiniec, L., Pelletier, G., Caboche, M., and Lecharny, A.** (2002). FLAGdb/FST: a database of mapped flanking insertion sites (FSTs) of Arabidopsis thaliana T-DNA transformants. *Nucleic acids research* **30**, 94-97.
- Simon, C., Langlois-Meurinne, M., Bellvert, F., Garmier, M., Didierlaurent, L., Massoud, K., Chaouch, S., Marie, A., Bodo, B., Kauffmann, S., Noctor, G., and Saindrenan, P.** (2010). The differential spatial distribution of secondary metabolites in Arabidopsis leaves reacting hypersensitively to *Pseudomonas syringae* pv. tomato is dependent on the oxidative burst. *Journal of experimental botany* **61**, 3355-3370.
- Sumner, L.W., Amberg, A., Barrett, D., Beale, M.H., Beger, R., Daykin, C.A., Fan, T.W., Fiehn, O., Goodacre, R., Griffin, J.L., Hankemeier, T., Hardy, N., Harnly, J., Higashi, R., Kopka, J., Lane, A.N., Lindon, J.C., Marriott, P., Nicholls, A.W., Reily, M.D., Thaden, J.J., and Viant, M.R.** (2007). Proposed minimum reporting standards for chemical analysis Chemical Analysis Working Group (CAWG) Metabolomics Standards Initiative (MSI). *Metabolomics : Official journal of the Metabolomic Society* **3**, 211-221.
- Taji, T., Takahashi, S., and Shinozaki, K.** (2006). Inositols and their metabolites in abiotic and biotic stress responses. *Sub-cellular biochemistry* **39**, 239-264.
- Tan, X., Calderon-Villalobos, L.I., Sharon, M., Zheng, C., Robinson, C.V., Estelle, M., and Zheng, N.** (2007). Mechanism of auxin perception by the TIR1 ubiquitin ligase. *Nature* **446**, 640-645.
- Torabinejad, J., and Gillasp, G.E.** (2006). Functional genomics of inositol metabolism. *Sub-cellular biochemistry* **39**, 47-70.
- Torabinejad, J., Donahue, J.L., Guneseckera, B.N., Allen-Daniels, M.J., and Gillasp, G.E.** (2009). VTC4 is a bifunctional enzyme that affects myoinositol and ascorbate biosynthesis in plants. *Plant physiology* **150**, 951-961.
- Wang, W., Yang, X., Tangchaiburana, S., Ndeh, R., Markham, J.E., Tsegaye, Y., Dunn, T.M., Wang, G.L., Bellizzi, M., Parsons, J.F., Morrissey, D., Bravo, J.E., Lynch, D.V., and Xiao, S.** (2008). An inositolphosphorylceramide synthase is involved in regulation of plant programmed cell death associated with defense in Arabidopsis. *The Plant cell* **20**, 3163-3179.
- Xiao, W., Sheen, J., and Jang, J.C.** (2000). The role of hexokinase in plant sugar signal transduction and growth and development. *Plant molecular biology* **44**, 451-461.
- Yoshida, K.T., Fujiwara, T., and Naito, S.** (2002). The synergistic effects of sugar and abscisic acid on myo-inositol-1-phosphate synthase expression. *Physiologia plantarum* **114**, 581-587.
- Zimmermann, P., Hirsch-Hoffmann, M., Hennig, L., and Gruissem, W.** (2004). GENEVESTIGATOR. Arabidopsis microarray database and analysis toolbox. *Plant physiology* **136**, 2621-2632.





**Figure 43. Effet de des mutations *hxxk1-1*, *mips1-1* et *mips2<sup>+/-</sup>* sur la teneur en MI.**

La teneur en MI de feuilles de rosettes des géotypes indiqués, 4 jours après transfert en JL, a été mesurée par GC-MS. Les proportions hypothétiques des activités de MIPS1 et de MIPS2 au sein des fonds génétiques Col-0 (violet) et *hxxk1-1* (rouge) sont indiquées par les accolades. MF : Matière fraîche.

### 3. Discussion et perspectives complémentaires

Les résultats présentés ci-dessus démontrent que la suppression des lésions dans le double mutant *mips1 hxx1* se ferait par une restauration de la synthèse de MI. Ainsi, HXX1 n'aurait pas un rôle direct dans la régulation de la MCP chez *mips1*. Son implication serait uniquement liée à son influence sur la production de MI via une action sur les différentes isoformes de MIPS.

Nos résultats mettent également en avant le rôle de l'isoforme MIPS2 dans la restauration de la biosynthèse de MI au sein du supprimeur *mips1 hxx1*. Par ailleurs, des résultats complémentaires ont révélé une accumulation de MI dans les simples mutants *hxx1-1* et *hxx1-2*, très supérieure à ce qui est mesuré chez Col-0 et chez le double mutant (Figure 43). Ces résultats étayaient l'hypothèse qu'une mutation de l'HXX1 conduirait à une activation des enzymes MIPS. Pour le tester, des mesures *in vivo* des activités enzymatiques MIPS, et des teneurs en MI pourraient être effectuées dans les lignées mutantes utilisées dans l'étude ci-dessus mais également dans les doubles mutants *mips2 hxx1* et *mips3 hxx1*. Un retour à une teneur en MI proche de celle observée chez Col-0 et chez le mutant *mips2 hxx1* irait dans le sens de cette hypothèse.

Cependant, les mécanismes régulant l'activité de l'enzyme MIPS2 lorsque *HXX1* est muté restent inconnus. Nos résultats indiquent seulement que le niveau d'accumulation des transcrits de *MIPS2* est équivalente à celle du type sauvage dans le contexte génétique *mips1 hxx1*. Il serait possible d'envisager une augmentation du temps de demi-vie de la protéine MIPS2, liée à un état plus stable et une diminution de sa dégradation. Afin de tester cette hypothèse, des western-blot sur des extraits protéiques issus des différentes lignées mutantes pourraient être réalisés avec des anticorps spécifiques de cette isoforme. Dans le cas où de tels anticorps seraient techniquement trop difficiles à obtenir, il serait aussi envisageable de transformer les lignées mutées *hxx1* avec un transgène codant l'enzyme MIPS2 étiquetée exprimé sous contrôle de son propre promoteur.

Il peut être également supposé que les changements métaboliques provoqués par l'inactivation d'HXX1 pourraient conduire à une activation allostérique de l'enzyme MIPS2. Dans ce cas, il serait envisageable de produire des formes recombinantes des enzymes MIPS et de mesurer leurs activités enzymatiques *in vitro*, en condition standard, ou dans des conditions métaboliques tentant de mimer celles des mutants *mips1* et *hxx1*.

Phénotypes du mutant <i>big</i>	Analyses cellulaires	Interprétations possibles	Références
<b>Diminution de la taille de la racine principale</b>	Cellules racinaires plus petites	La protéine BIG pourrait être impliquée dans le trafic vésiculaire ce qui pourrait affecter la localisation polarisée de certains facteurs dont les transporteurs d'auxine. Ceci pourrait expliquer la diminution de l'intensité des maxima d'auxine dans les méristèmes ou à l'extrémité des feuilles observée chez <i>big</i> .	(Guo <i>et al.</i> 2013, Lopez-Bucio <i>et al.</i> 2005, Ruegger <i>et al.</i> 1997, Yamaguchi and Komeda 2013, Yamaguchi <i>et al.</i> 2007)
<b>Diminution du nombre de racines latérales</b>	Défaut d'activation des cellules du péricycle qui initient les racines latérales		
<b>Diminution de la taille des entrenœuds de l'inflorescence</b>	Défaut d'élongation et de division cellulaire		
<b>Pédicelles plus courts</b>	Défaut d'élongation et de division cellulaire		
<b>Surface des feuilles de rosettes diminuée</b>	Défaut d'élongation et de division cellulaire		
<b>Diminution de la dominance apicale (plus d'inflorescences)</b>	Pas de donnée	Défaut du transport de l'auxine	(Ruegger <i>et al.</i> 1997)
<b>Retard de floraison</b>	Pas de donnée	Inconnu	(Kanyuka <i>et al.</i> 2003)
<b>Graines plus petites</b>	Pas de donnée	Inconnu	(Kanyuka <i>et al.</i> 2003)
<b>Elongation racinaire moins inhibée par les cytokinines</b>	Pas de donnée	Inconnu	(Kanyuka <i>et al.</i> 2003)
<b>Elongation racinaire moins inhibée par l'éthylène</b>	Pas de donnée	Inconnu	(Kanyuka <i>et al.</i> 2003)
<b>Homéostasie des gibbérellines légèrement affectée</b>	Pas de donnée	Dérégulation de l'expression du gène <i>GA20ox</i>	(Desgagne-Penix <i>et al.</i> 2005, Kanyuka <i>et al.</i> 2003)
<b>Forte expression à l'obscurité de l'expression de gènes impliqués dans la photosynthèse, normalement réprimés chez le sauvage dans cette condition</b>	Pas de donnée	Implication de l'auxine, car l'ajout d'auxine au milieu de culture restaure un niveau d'expression normal	(Gil <i>et al.</i> 2001, Li <i>et al.</i> 1994)
<b>Stress mitochondrial accentué</b>	Pas de donnée	Implication de l'auxine car les voies de signalisation de cette hormone seraient antagonistes à celles du stress mitochondrial	(Ivanova <i>et al.</i> 2014)

**Tableau 3. Synthèse des données de la littérature concernant l'analyse phénotypique du mutant *big*.**

### III. Le supprimeur *mips1 somi2*

#### 1. Introduction

Le deuxième supprimeur caractérisé au cours de ma thèse a été *mips1 somi2*. La mutation *somi2* étant récessive dans un contexte supprimeur diploïde, les mêmes approches de génétique que celles suivies lors de l'étude de *mips1 hxl1*, ont été déployées et elles ont permis de mettre en évidence qu'une délétion ponctuelle dans le gène *BIG*<sup>1</sup> (AT3G02260) est responsable de la suppression de la MCP chez *mips1 somi2*.

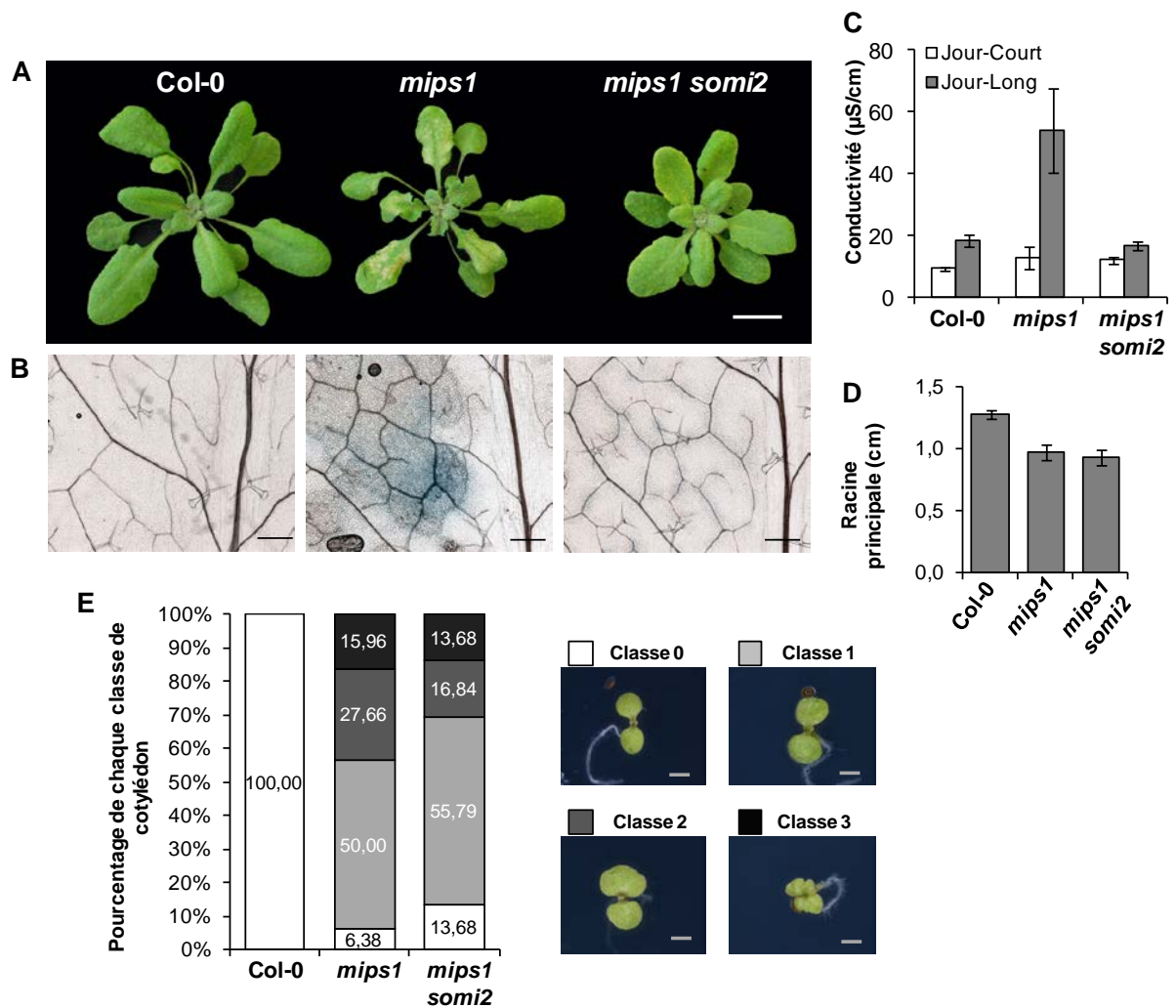
Ce gène, sans doute nommé ainsi en raison de sa très grande taille (17506 pb), code une protéine dont la localisation subcellulaire et la fonction moléculaire sont encore inconnues. Des analyses par homologies de séquences, indiquent que la protéine pourrait contenir en C-terminal un domaine E3 ubiquitine ligase, et des motifs de type doigts zinc au centre de la séquence.

Bien que sa fonction biochimique ne soit pas identifiée, les approches génétiques ont démontré l'importance du rôle joué par BIG tout au long de la vie des plantes. En effet, la mutation du gène *BIG* provoque un phénotype très pléiotrope, à l'origine de nombreuses anomalies du système racinaire, des feuilles de rosette et des inflorescences répertoriées dans le Tableau 3.

Un rôle majeur de la protéine BIG est son implication dans le transport de l'auxine au sein de la plante. BIG serait nécessaire au maintien d'un trafic vésiculaire correct, ce qui assure la localisation polarisée des transporteurs d'auxine, tel que PIN1, et donc l'acheminement correct de l'hormone dans les tissus (Guo *et al.* 2013, Lopez-Bucio *et al.* 2005, Ruegger *et al.* 1997, Yamaguchi and Komeda 2013, Yamaguchi *et al.* 2007). Chez le mutant *big*, l'altération de ce transport pourrait être à l'origine de plusieurs des défauts de développement observés.

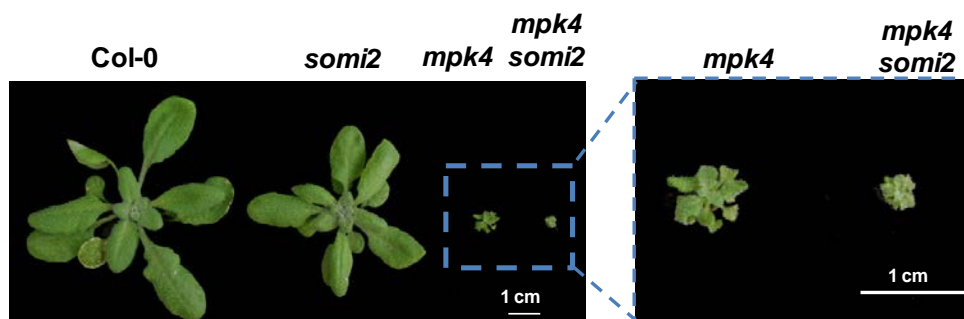
Plus récemment, une étude a montré que le mutant *big* serait plus sensible au stress mitochondrial car il surexprime constitutivement le gène *ALTERNATIVE OXIDASE 1 (AOX1)*, un marqueur de ce stress (Ivanova *et al.* 2014). A nouveau, ce phénotype serait lié l'altération du transport de l'auxine dans *big*, puisque les auteurs démontrent que les signalisations de l'auxine et du stress mitochondrial sont antagonistes.

<sup>1</sup> Identifié à la suite de cribles génétiques indépendants, le gène *BIG* possède plusieurs dénominations dans la littérature : *ATTENUATED SHADE AVOIDANCE 1 (ASA1)*, *CORYMBOSA1 (CRM1)*, *DARK OVER-EXPRESSION OF CAB 1 (DOC1)*, *LOW PHOSPHATE-RESISTANT ROOT 1 (LPR1)*, *TRANSPORT INHIBITOR RESPONSE 3 (TIR3)*, *UMBRELLA 1 (UMB1)*. Seul le terme *BIG* sera utilisé dans la suite du manuscrit, et les lignées mutées pour ce gène seront nommées *big*.



**Figure 44. Phénotypes du suppresseur *mips1 somi2*.**

Le suppresseur *mips1 somi2* ne présente plus aucune lésion visible 4 jours après transfert en JL (A), ce qui est confirmé par une coloration au bleu de trypan (B) et une mesure de la fuite d'électrolytes (C). La mutation *somi2* ne permet pas de restaurer la taille de la racine principale (D), ou de supprimer les anomalies des cotylédons (E).  $\mu\text{S} = \mu\text{Siemens}$  ; Barre photo = 1 cm ; Barre bleu de trypan = 500  $\mu\text{m}$  ; Barre cotylédons = 1mm.



**Figure 45. Phénotype du mutant *mpk4 somi2*.**

Par ailleurs, au regard d'autres anomalies macroscopiques et moléculaires décrites chez ce mutant (Tableau 3), la protéine BIG pourrait également être impliquée dans des voies de signalisations impliquant l'action d'autres phytohormones et de celle de la lumière.

## 2. Résultats

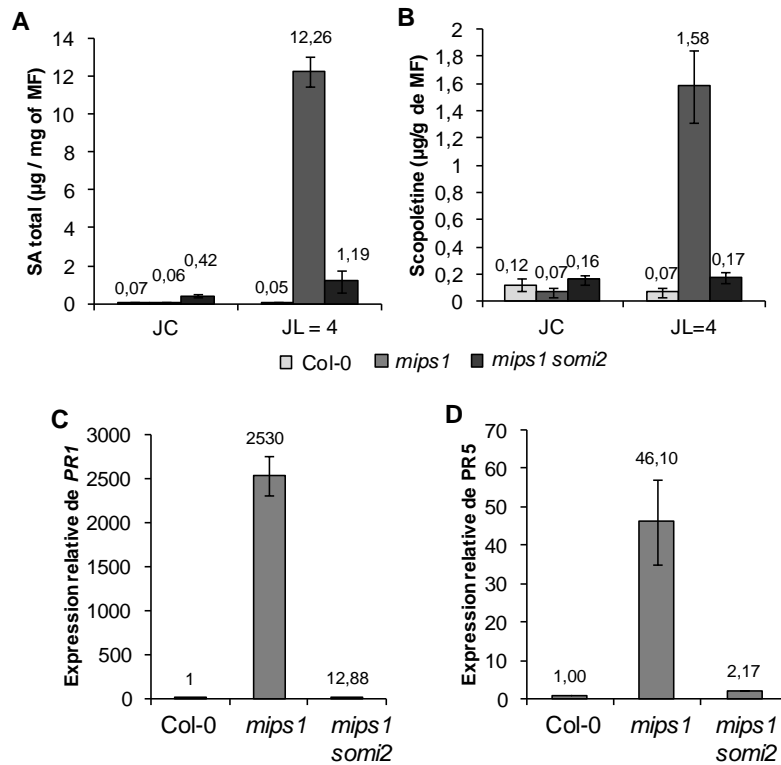
### 2.1. Caractérisations phénotypiques

Le double mutant *mips1 somi2* supprime complètement l'apparition des lésions visibles à l'œil, qui se développent normalement sur les feuilles de rosette du mutant *mips1* après transfert en JL (Figure 44A). Cette suppression est confirmée par une coloration au bleu de trypan (Figure 44B) et la mesure de la fuite d'électrolytes (Figure 44C).

Au cours du crible génétique, les supresseurs ont été sélectionnés uniquement pour la suppression des lésions en conditions restrictives, et non pour le fait qu'ils restaurent totalement un phénotype sauvage. Le supresseur *misp1 somi2* ne présente plus de lésions sur les feuilles, mais la rosette n'est pas totalement identique à celle du sauvage Col-0 (Figure 44A). En effet, les pétioles sont plus courts et les feuilles d'une surface inférieure comparée à celle de Col-0. L'aspect des plantes est donc plus « compact » avec une surface totale de la rosette diminuée.

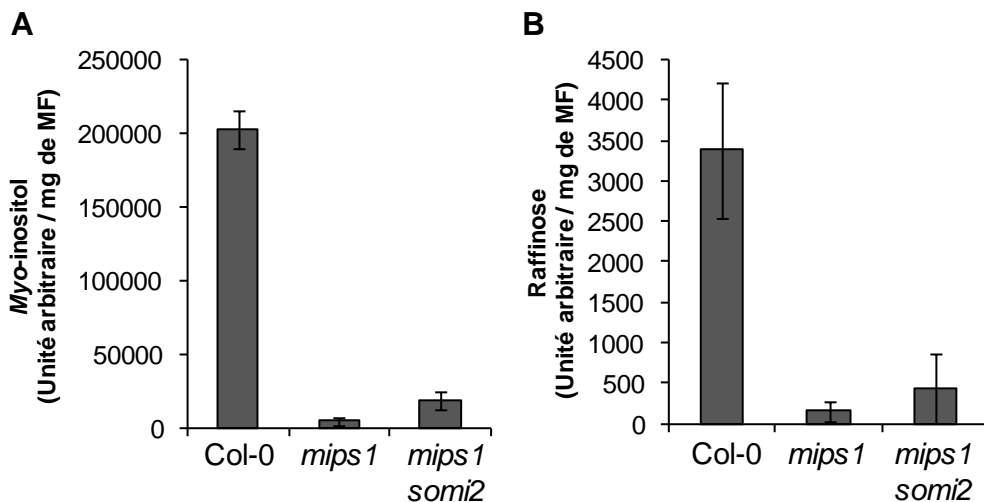
Comme décrit dans l'introduction, le mutant *mips1* présente également une racine principale plus courte et des anomalies lors du développement embryonnaire conduisant à une altération de la morphologie des cotylédons. Ces phénotypes ont été analysés chez le supresseur *mips1 somi2* (Figure 44D et E). Chez le supresseur, la racine principale reste d'une taille similaire à celle de *mips1*, plus courte que la racine principale de Col-0 (Figure 44D). Afin d'analyser la morphologie des cotylédons dans les différents génotypes, 4 classes ont été définies en fonction de la sévérité des phénotypes, et la proportion de chacune de ces classes a été mesurée (Figure 44E). Le supresseur *mips1 somi2* présente des proportions similaires au mutant *mips1* pour chaque classe (Figure 44E).

Dans le but de tester si BIG aurait une action plus large que l'établissement des lésions uniquement chez le mutant *mips1*, *somi2* a été croisé avec le LMM *mpk4*. Le double mutant *mpk4 somi2* obtenu ne présente pas de suppression du phénotype du simple mutant *mpk4*, mais au contraire un phénotype accentué avec un nanisme encore plus important (Figure 45). Ceci indique que BIG jouerait un rôle dans l'atténuation des réponses de défenses constitutivement induites chez le mutant *mpk4*.



**Figure 46. Analyse de la voie SA chez *mips1 somi2*.**

Dosage de la teneur en SA total (A) et en scopolétine (B) dans des feuilles de rosettes des génotypes indiqués, 4 jours après transfert en JL. Analyse de l'expression des gènes *PR1* (C) et *PR5* (D) par RT-PCRq, dans des feuilles de rosettes 4 jours après transfert en JL. L'expression du gène *UBQ10* a été utilisée comme référence et les valeurs d'expression obtenues ont été normalisées par rapport à celle du sauvage Col-0. Les chiffres au-dessus des barres d'histogrammes correspondent aux valeurs mesurées et utilisées pour faire les graphiques.



**Figure 47. Dosage du MI et du raffinose dans le suppresseur *mips1 somi2*.**

Les teneurs en MI (A) et en raffinose (B) ont été dosées par GC-MS à partir de feuilles de rosettes des génotypes indiqués, 4 jours après transfert en JL. MF = Matière fraîche.

*Ces résultats indiquent que la mutation *somi2* supprime spécifiquement le phénotype de l'apparition des lésions du mutant *mips1* en JL, sans modifier les anomalies racinaires et cotylédonaire.*

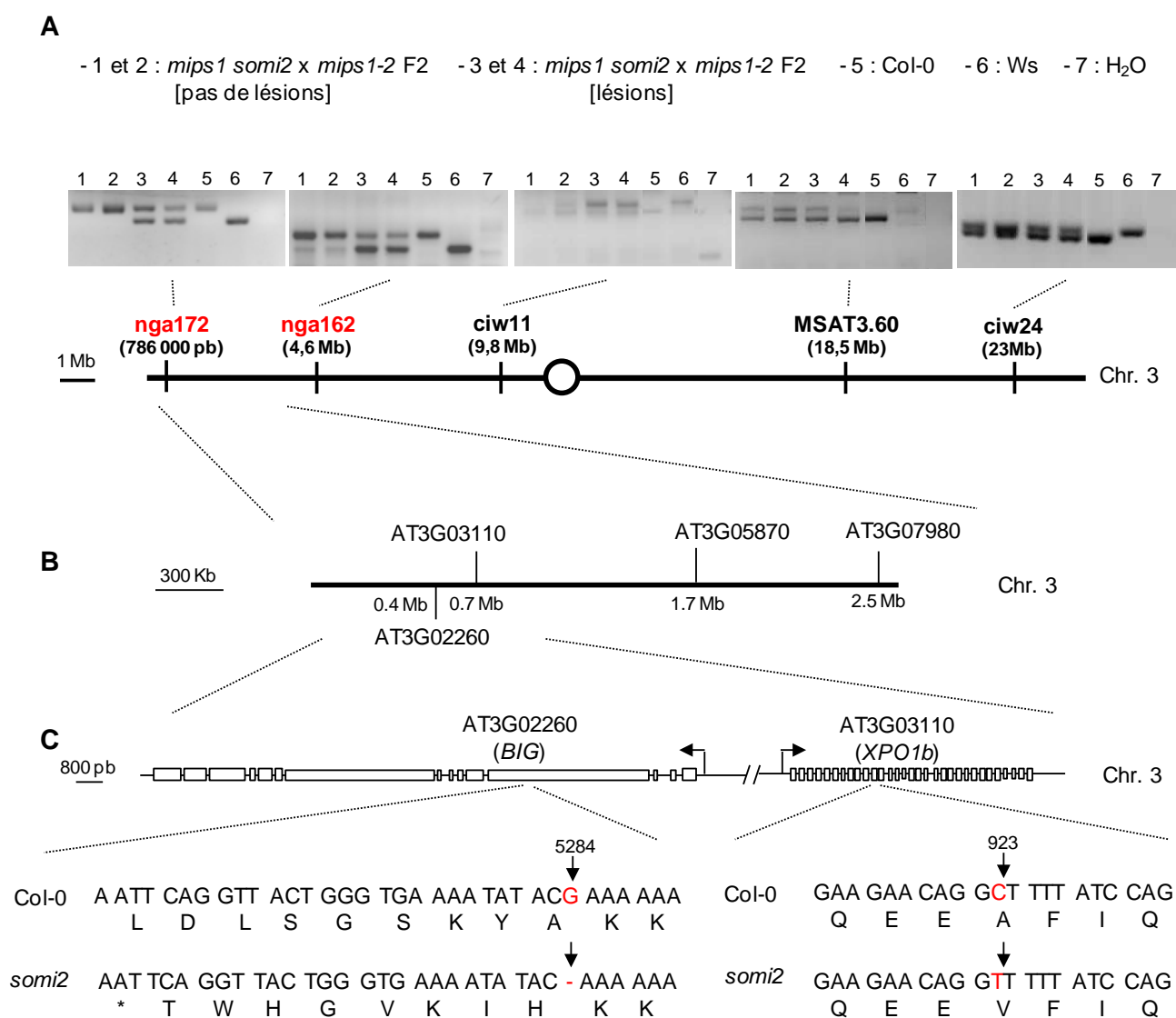
## 2.2. Analyses métaboliques

Dans le but de savoir si la mutation *somi2* supprime l'apparition des lésions en amont ou en aval de l'accumulation de SA, la teneur de ce composé a été mesurée dans les feuilles de rosette en JC et 4 jours après transfert en JL. En JC, comme attendu, la teneur en SA total dans le mutant *mips1* est similaire à celle du sauvage Col-0. Cependant le supprimeur *mips1 somi2* présente une accumulation en SA environ 7 fois supérieure à celle *mips1* (Figure 46A). Après 4 jours en JL, *mips1* accumule très fortement le SA et présente une concentration équivalente à environ 250 fois de celle observée chez Col-0 (Figure 46A). Cette accumulation de SA n'est que partiellement supprimée chez *mips1 somi2*. En effet, même si la teneur en SA dans ce supprimeur est diminuée d'environ 10 fois par rapport à *mips1*, elle reste très supérieure à ce qui est mesuré dans Col-0. La mesure de l'expression des gènes *PR1* et *PR5*, induites par la voie du SA, confirme ces données. Ces 2 gènes sont très fortement induits chez *mips1*, 4 jours après transfert en JL, mais cette induction n'est pas totalement abolie dans le supprimeur *mips1 somi2* (Figure 46C et D). L'analyse de la teneur en scopolétine semble également montrer que son accumulation observée chez *mips1* en JL n'est pas totalement supprimée par la mutation *somi2* (Figure 46B).

Chez le supprimeur *mips1 somi1*, la suppression des lésions s'expliquerait par une restauration de la synthèse de MI (§II.2). Afin de tester si un processus similaire est observé chez *mips1 somi2*, la teneur en MI a été mesurée par GC-MS, 4 jours après transfert en JL. Une diminution drastique de la teneur en MI est observée chez *mips1* comparée à celle de Col-0 (Figure 47A). Dans le génotype *mips1 somi2*, la teneur en MI est très légèrement supérieure à celle observée chez *mips1*, mais reste très inférieure à celle de Col-0 (Figure 47A). Des observations similaires peuvent être faites pour le raffinose (Figure 47B).

*Même si l'accumulation de SA n'est pas totalement abolie dans le supprimeur *mips1 somi2*, la mutation *somi2* supprime les lésions du mutant *mips1* en agissant en amont de l'induction de la production de SA. De plus, la teneur en MI reste très faible chez *mips1 somi2*, même si elle reste supérieure à celle de *mips1*. La suppression des lésions dans ce supprimeur pourrait ne pas être due à une restauration de la synthèse de MI.*





**Figure 48. Cartographie de la mutation *somi2*.**

Le suppressor *mips1 somi2*, dans le fond génétique Col-0, a été croisé avec le mutant *mips1-2*, dans le fond génétique WS. A partir des descendants F2 (avec ou sans lésions) issus de ce croisement, la technique de « Bulk Segregant Analysis » a été utilisée afin de localiser à large échelle la mutation *somi2*, et a permis de la situer entre le haut du chromosome 3 et une zone comprise entre les marqueurs nga172 et nga162 (A). L'ADN nucléaire de 116 F2 sans lésions a été « poolé » en un seul échantillon qui a été entièrement séquencé par séquençage à haut débit (Illumina Hiseq 2000, entreprise BGI Tech solutions). En utilisant le logiciel CLC genomic worbench et le génome du sauvage Col-0 comme référence (TAIR10), des mutations présentes dans 100% des « reads » de 4 gènes ont pu être identifiées (B). Des marqueurs « Derived Cleaved Amplified Polymorphic Sequences » ont été utilisés sur 26 plantes *mips1 somi2* obtenues après plusieurs rétrocroisements avec *mips1*, et ont permis de restreindre les candidats à 2 mutations présentes dans les gènes *BIG* (AT3G02260) et *XPO1b* (AT3G03110).

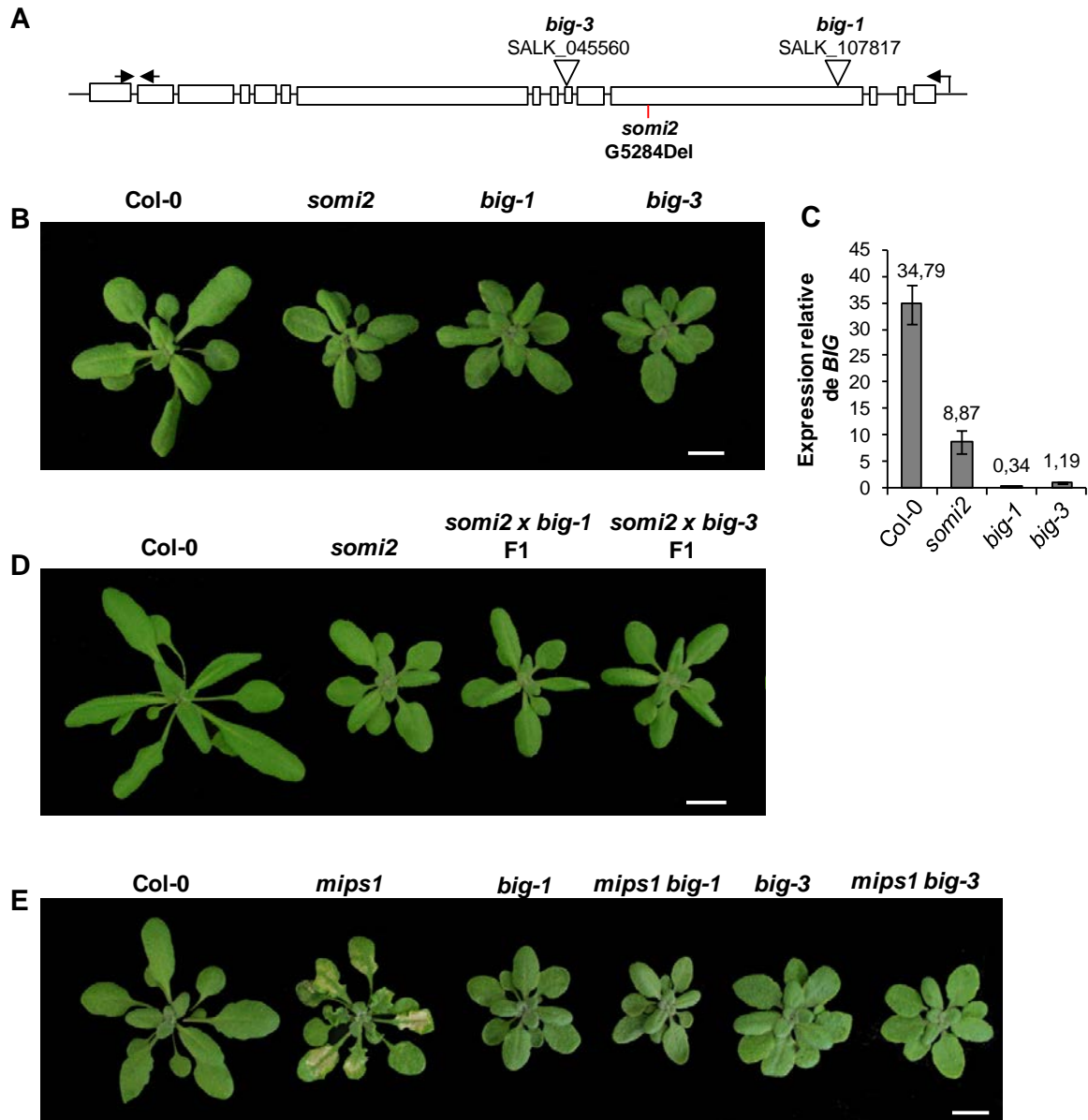
### 2.3. Cartographie et identification de *SOMI2*

Afin d'identifier la mutation *somi2*, responsable de la suppression des lésions, le double mutant *mips1 somi2*, dans l'écotype Col-0, a été croisé avec le mutant *mips1-2* dans l'écotype Ws. La mutation *somi2* étant récessive, les descendants F1, issus de ce croisement, présentaient tous des lésions puisque les deux copies du gène *MIPS1* étaient mutées. Après autofécondation des plantes F1 et brassage génétique, certaines plantes sans lésion réapparaissaient dans la descendance F2. Ces individus étaient donc homozygotes pour le locus *somi2* localisé sur une partie du génome de type Col-0.

C'est sur ce principe qu'est basée la technique de « Bulk Segregant Analysis » (BSA), que nous avons utilisée afin de positionner de manière approximative le locus *somi2*. Pour cela, l'ADN de 11 plantes F2 sans lésions et celui de 11 plantes F2 avec lésions, a été extrait et « poolé » en 2 échantillons en fonction du phénotype des plantes d'origine (avec ou sans lésions). Des PCR ont été réalisées sur ces deux échantillons et sur de l'ADN issus de plantes sauvage Col-0 et Ws, en utilisant des amorces de marqueurs microsatellites répartis tout le long du génome, polymorphes entre Col-0 et Ws. Cette analyse a permis de positionner la mutation *somi2* sur le haut du chromosome 3 entre son extrémité et une zone située entre les marqueurs *nga172* et *nga162* (Figure 48A).

Par la suite, le génome nucléaire issu d'un « pool » de 116 plantes F2, sans lésions, a été entièrement séquençé par une technique de séquençage haut débit (*Illumina Hiseq 2000*, réalisé par l'entreprise *BGI tech sloution*). Les séquences obtenues, d'environ 100 pb, appelées « reads », ont été alignées sur le génome de référence Col-0, à l'aide du logiciel CLC genomic workbench®. Le nombre de « reads » obtenu a permis de couvrir environ 50 fois le génome d'*Arabidopsis*. Avec ce même logiciel, les mutations de type substitution, ou petites insertions et délétions, ont été identifiées, en comparaison avec le génome de Col-0. Ainsi, 4 gènes se situant au début du chromosome 3 et présentant chacun une mutation identifiée dans 100% des « reads » (Figure 48B) ont été sélectionnés. Il s'agit des gènes AT3G02260 (*BIG*), AT3G03110 (*EXPORTINE 1b* ; *XPO1b*), AT3G05870 (*ANAPHASE-PROMOTING COMPLEX 11* ; *APC11*) et AT3G07980 (*MAP KINASE KINASE KINASE 6* ; *MPK6*).

Après deux rétrocroisements de *mips1 somi2* avec le mutant *mips1*, afin d'éliminer le maximum de mutations provoquées par l'EMS indépendantes de la mutation *somi2*, des marqueurs de type « Derived Cleaved Amplified Polymorphic Sequences » (dCAPS) ont été utilisés sur 26 plantes *mips1 somi2* pour sélectionner les SNPs liés au locus *somi2*. Cette analyse a permis de ne conserver que 2 gènes candidats: *BIG*, un très grand gène codant une protéine dont la



**Figure 49. La mutation *somi2* correspond à une délétion dans le gène *BIG*.**

La structure du gène *BIG* est représentée ainsi que la position de la délétion présente dans le mutant *mips1 somi2* et la position de chacune des insertions des lignées mutantes *big-1* et *big-3* (A). Le simple mutant *somi2* a été obtenu après croisement entre le suppressor *mips1 somi2* et le sauvage Col-0, et le phénotype de sa rosette a été comparé à celui des lignées *big-1* et *big-3* (B). Analyse de l'expression du gène *BIG* (en utilisant les amorces représentées par des flèches en A) par RT-PCRq chez les mutants *somi2*, *big-1* et *big-3* en comparaison au Col-0 (C). Les chiffres au-dessus des barres d'histogrammes correspondent aux valeurs d'expression. Un test de complémentation a été effectué en croisant le mutant *somi2* avec *big-1* ou *big-2*, et les rosettes des descendants F1 issus de ces croisements ont été analysées (D). Les simples mutants *big-1* et *big-3* ont été croisés avec *mips1* pour obtenir les doubles mutants correspondants, puis l'apparition des lésions 5 jours après transfert en JL a été observée (E). Barres sur les photos = 1 cm.

fonction est encore inconnue, et *XPO1b*, un des deux paralogues d'*Arabidopsis* codant une protéine cargo impliquée dans l'export nucléo-cytoplasmique des protéines (Figure 48C). La mutation dans *BIG* correspond à la délétion d'une guanine, ce qui conduit à un décalage du cadre de lecture et l'apparition précoce d'un codon stop (Figure 48C), alors que la mutation dans *XPO1b* est une substitution d'une cytosine en thymine, remplaçant une alanine par une valine (Figure 48C).

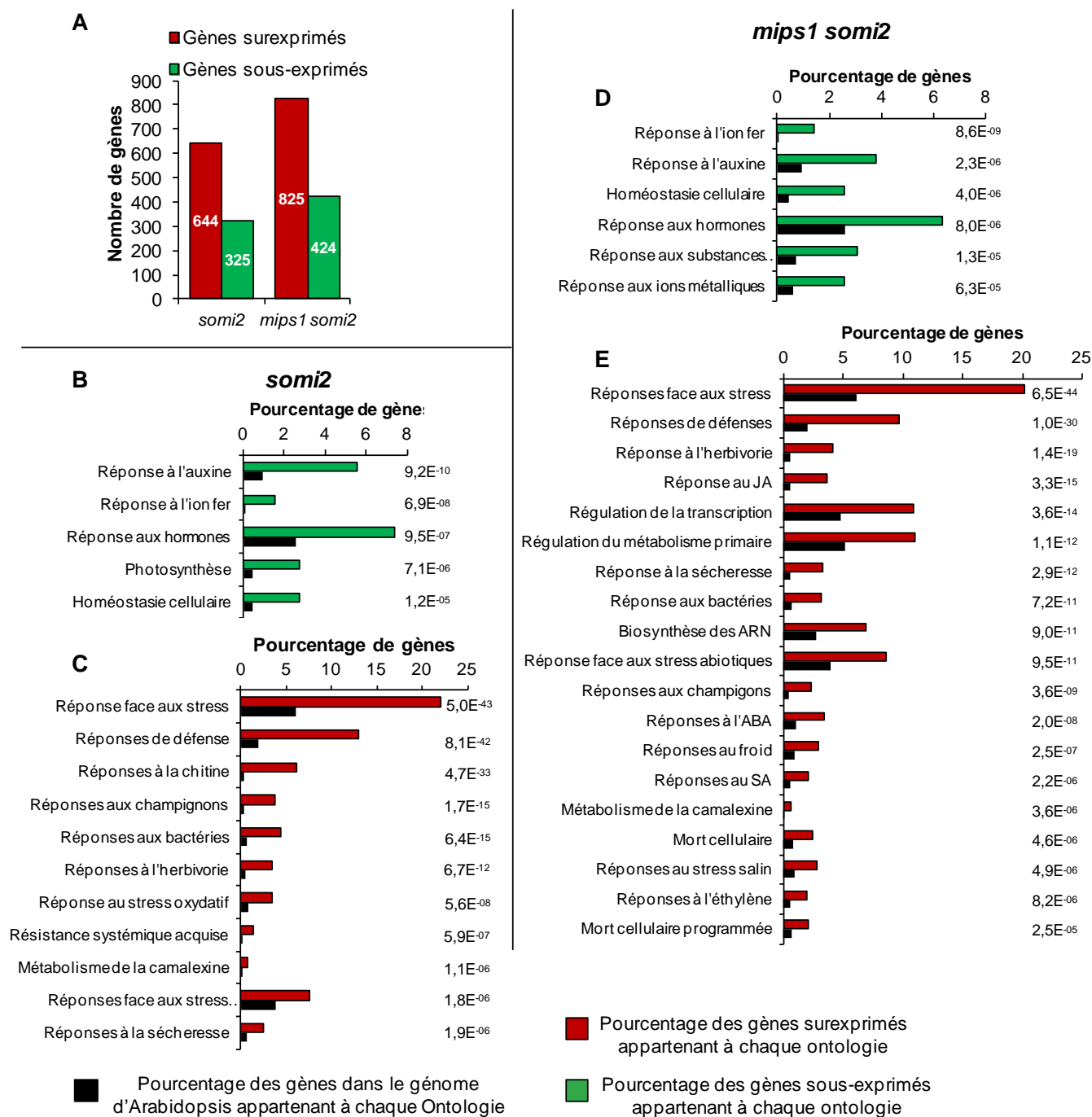
Il faut noter, que la délétion observée chez *BIG* était plutôt inattendue puisque l'EMS provoque la conversion d'une guanine en adénine, et donc une mutation de type substitution. On peut donc supposer que l'EMS a effectivement provoqué ce type de substitution, ce qui a rajouté une adénine supplémentaire à la suite de 6 autres adénines (Figure 48C). Par la suite, la polymérase aurait pu « glisser » sur ces 7 adénines et commettre l'erreur de n'en polymériser que 6, ou l'adénine en trop aurait pu être détectée et éliminée.

Dans le but d'identifier *SOMI2*, le double mutant *mips1 somi2* a ensuite été complémenté avec une forme sauvage de l'ADNc codant la protéine XPO1b. Le mutant *mips1* a également été croisé avec des lignées d'insertions pour le gène *XPO1b*. Cependant, les doubles mutants *mips1 xpo1b* développaient toujours des lésions, et la complémentation avec une forme sauvage de *XPO1b* ne permettait pas de restaurer le phénotype *mips1* (données non présentées).

L'ADNc du gène *BIG* étant de très grande taille (15297pb), son clonage n'a pas été tenté et nous avons utilisé plusieurs lignées d'insertion présentant un ADN-T dans ce gène. Il s'agit des lignées *big-1* (SALK\_045560), qui possède un ADN-T dans le 3<sup>ème</sup> exon, avant la délétion observée chez *somi2*, et *big-3* (SALK\_107817), qui possède un ADN-T dans le 6<sup>ème</sup> exon, après la délétion observée chez *somi2* (Figure 49A).

Dans le but d'obtenir une lignée *somi2* la plus isogénique possible, et de mettre en évidence les phénotypes imputables uniquement à la mutation *somi2*, la lignée *mips1 somi2* a été croisée pendant 3 générations successives avec le sauvage Col-0. Le simple mutant *somi2* présente toujours son phénotype caractéristique avec une rosette plus « compacte » que le sauvage (Figure 49B). Ceci indique que ce phénotype ne serait imputable qu'à la mutation *somi2*, et non aux effets additionnés des mutations *mips1* et *somi2* par exemple. De plus l'observation des mutants *big-1* et *big-3* indique que leurs rosettes présente un phénotype équivalent à celui du mutant *somi2* (Figure 49B): les pétioles sont courts, et la rosette est compacte.

Un test de complémentation a ensuite été réalisé afin de déterminer si la mutation *somi2* est allélique à *big-1* et *big-3*. Les plantes F1 issues du croisement entre *somi2* et *big-1*, et entre *somi2*



**Figure 50. Analyse des gènes surexprimés et sous-exprimés dans *somi2* et *mips1 somi2*.**

Nombre de gènes surexprimés ou sous-exprimés dans les mutant *somi2* et *mips1 somi2* par rapport à Col-0, 4 jours après transfert en JL (A). Les ontologies (ici les processus cellulaires) auxquelles appartiennent ces gènes différentiellement exprimés ont été déterminées à l'aide du logiciel en ligne AgriGO (Du *et al.* 2010) pour *somi2* (B et C) et *mips1 somi2* (D et E). Toutes les ontologies représentées sont significativement enrichies. Les « P values » sont indiquées à droite des barres d'histogramme.

et *big-3*, présentent le même phénotype que le mutant *somi2* (Figure 49D) indiquant que *somi2* est un nouvel allèle des mutants *big*.

L'analyse par RT-PCRq de l'expression du gène *BIG*, montre que celui-ci est très fortement sous-exprimé dans les deux lignées *big-1* et *big-3* (Figure 49C). Ce gène est également sous-exprimé dans le mutant *somi2*, alors qu'il est peu probable qu'une délétion d'un seul nucléotide au milieu d'un exon affecte la transcription d'un gène. Cela suggère donc que la protéine BIG pourrait être impliquée directement ou indirectement dans le contrôle de sa propre transcription ou de la stabilité de ses messagers. Une autre hypothèse serait que le codon stop précoce induit par la mutation *somi2* soit détecté par le mécanisme de « Non-sense Mediated Decay » (NMD), impliqué dans la dégradation des ARNm présentant justement un codon stop prématuré chez les eucaryotes (Chang *et al.* 2007).

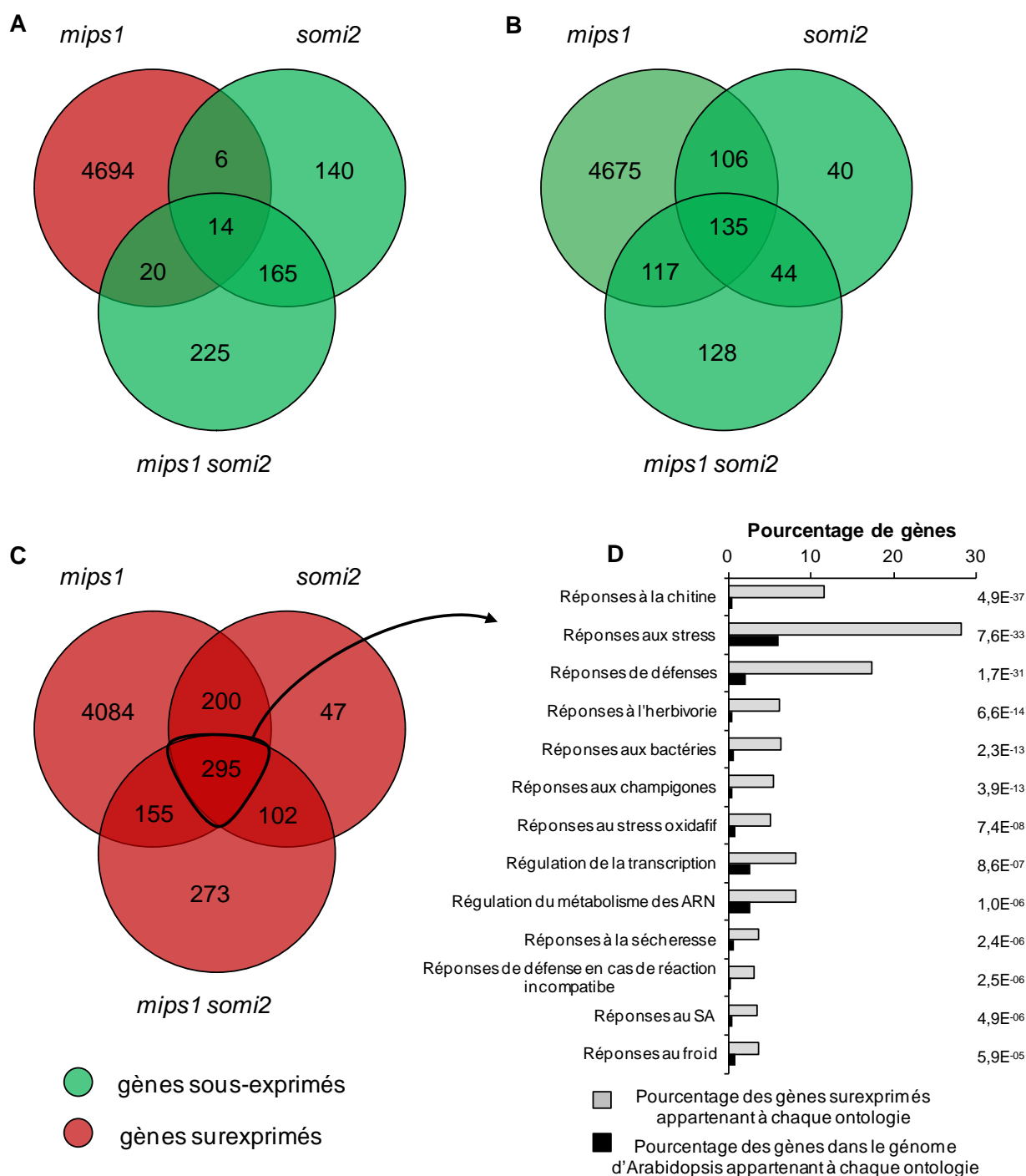
Enfin, les mutants *big-1* et *big-3* ont été croisés avec *mips1* afin d'obtenir les doubles mutants correspondants. L'analyse des feuilles de rosette 5 jours après transfert en JL montre que le mutant *mips1* présente de nombreuses lésions alors que les doubles mutants *mips1 big-1* et *mips1 big-3* ne possèdent aucune lésion visible (Figure 49E).

*L'ensemble de ces résultats indique que la mutation située dans le gène BIG, une délétion produisant une protéine tronquée, est responsable de la suppression de la mort cellulaire dans le supprimeur mips1 somi2.*

#### **2.4. Analyse transcriptomique du supprimeur *mips1 somi2***

Dans le but de comprendre si la suppression des lésions dans le supprimeur *mips1 somi2*, est liée à une dérégulation transcriptionnelle de l'expression de gènes clés, nous avons réalisé le transcriptome de *mips1 somi2* et du simple mutant *somi2*. Au cours de cette approche, les ARN ont été extraits à partir de feuilles de rosette 4 jours après transfert en JL et hybridés sur des puces CATMA v6. Le transcriptome du mutant *mips1*, dans les mêmes conditions, a également été rééduit afin de pouvoir effectuer une comparaison sur des puces plus récentes et de même génération. Les valeurs d'expression obtenues dans les mutants *mips1*, *somi2* et *mips1 somi2* sont relatives aux valeurs d'expression de ces mêmes gènes chez le sauvage Col-0.

Le graphique en Figure 50A montre que 644 gènes sont surexprimés et 325 sous-exprimés dans le mutant *somi2*, alors que le mutant *mips1 somi2* présente légèrement plus de gènes différentiellement exprimés (825 surexprimés et 424 sous-exprimés).



**Figure 51. Comparaison des transcriptomes des mutants *mips1*, *somi2* et *mips1 somi2*.**

Représentations en diagrammes de Venn obtenues par comparaisons entre les mutants *mips1*, *somi2* et *mips1 somi2* des gènes différentiellement exprimés (A, B et C). Dans les trois génotypes l'expression des gènes analysée 4 jours après transfert en JL est relative à Col-0. Les chiffres dans les cercles représentent le nombre de gènes. Les ontologies (ici processus cellulaires des gènes surexprimés dans les trois génotypes (intersection des 3 cercles ; C) ont été déterminées à l'aide du logiciel AgriGo (D).

Afin de déterminer si ces dérégulations transcriptionnelles concernent des gènes impliqués dans des processus cellulaires particuliers, l'ontologie des gènes surexprimés ou sous-exprimés a été déterminée à l'aide du logiciel en ligne AgriGO (Du *et al.* 2010). Ce logiciel permet également de classer et de comparer le pourcentage de gènes impliqués dans chaque processus au pourcentage de gènes impliqués dans ces mêmes processus au sein du génome d'*Arabidopsis*. Cela permet de déterminer si certaines fonctions cellulaires sont surreprésentées dans une liste de gènes. Dans les mutants *somi2* et *mips1 somi2* peu de processus apparaissent surreprésentés au sein des gènes sous-exprimés (Figure 50B et D), cependant, ils sont similaires dans les deux génotypes, tels que les réponses à l'auxine et au fer ou encore l'homéostasie cellulaire par exemple. Dans le mutant *mips1 somi2*, la mutation *mips1* a donc peu d'effet sur la sous-expression des gènes impliqués dans ces processus. Concernant les gènes surexprimés dans le mutant *somi2*, il semble que ceux-ci soient impliqués de manière générale dans les réponses aux stress, biotiques et abiotiques (Figure 50C). Des observations similaires peuvent être faites pour les gènes surexprimés dans le suppresseur *mips1 somi2* (Figure 50E), mais dans ce cas, la mutation *mips1* semble avoir un effet synergique. En effet des processus relatifs au stress sont surreprésentés chez le double mutant, comparé à *somi2*, tels que les réponses au SA, au JA et à l'ABA, la MCP ou encore le métabolisme de la camalexine (Figure 50E). Le métabolisme des ARN et la régulation de la transcription apparaissent également dans cette catégorie, signe qu'un remodelage important de la transcription est en cours.

Par la suite, les transcriptomes des mutants *somi2* et *mips1 somi2* ont été croisés avec celui de *mips1*. Le diagramme de Venn de la Figure 51A montre que l'immense majorité des gènes dérégulés dans le mutant *mips1* ne l'est plus dans le mutant *mips1 somi2*. Par ailleurs, très peu des gènes surexprimés dans le mutant *mips1* sont à l'inverse, sous-exprimés dans les mutants *somi2* et *mips1 somi2*. De plus, l'analyse de l'ontologie des gènes présents dans les intersections entre *mips1* et *somi2*, *mips1* et *mips1 somi2* et entre les trois génotypes, ne révèle pas de processus particulièrement représenté (donnée non montrée). L'intersection des transcriptomes des lignées *somi2* et *mips1 somi2* correspond aux gènes impliqués dans les réponses à l'auxine (donnée non montrée). Des observations similaires peuvent être faites par comparaison des gènes sous-exprimés chez *mips1* et ceux surexprimés chez *somi2* et *mips1 somi2* : très peu de gènes sont présents dans les intersections, et l'analyse ontologique des gènes dans ces intersections ne permet pas de mettre en évidence des processus particulièrement représentés (données non montrées). La comparaison des gènes sous-exprimés dans les 3 génotypes montre qu'une grande partie des gènes sous-exprimés dans *somi2* et *mips1 somi2* le sont également dans *mips1* (Figure 51B). De





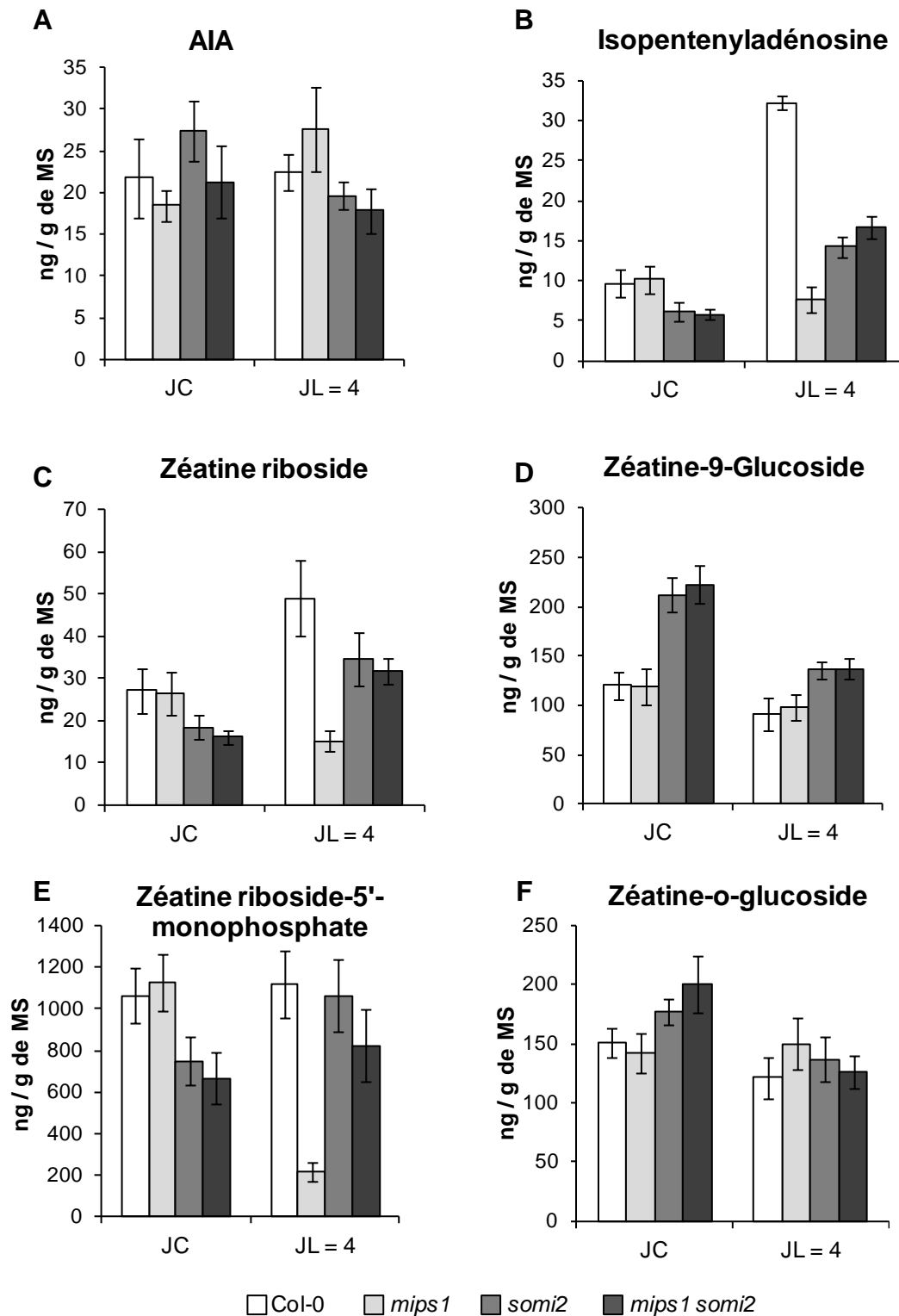
plus, les gènes présents dans les intersections avec *mips1* sont impliqués dans les processus mis en évidence dans les gènes sous-exprimés dans les mutants *somi2* et *mips1 somi2* (donnée non montrée). Comme attendu, de nombreux gènes surexprimés dans les lignées *somi2* et *mips1 somi2* le sont également dans le mutant *mips1* (Figure 51C). Les processus représentés dans l'intersection entre les trois génotypes, soit 295 gènes, sont également en lien avec les réponses aux stress biotiques et abiotiques ainsi que la régulation de la transcription (Figure 51D).

*Ces résultats montrent que la mutation du gène BIG, dans les mutants somi2 et mips1 somi2, altère l'expression de gènes impliqués dans les réponses à l'auxine, ce qui est en accord avec le rôle dans le transport d'auxine de la protéine BIG. De manière surprenante, des gènes impliqués dans les réponses aux stress biotiques et abiotiques sont surexprimés dans le mutant somi2, et la mutation mips1 accroît cette dérégulation. Ceci est l'inverse de ce qui pourrait être attendu pour un suppresseur de la MCP (comme il l'avait été observé chez mips1 oxt6 par exemple). Ces gènes sont également surexprimés chez mips1. De plus, il semble que très peu de gènes surexprimés dans mips1 soient au contraire sous-exprimés dans les lignées mips1 somi2 ou somi2. Ceci suggère donc que la suppression des lésions par la mutation somi2 ne passe pas par une dérégulation de l'expression des gènes impliqués dans l'établissement de ce phénotype en JL.*

## 2.5. Dosages hormonaux

La protéine BIG serait impliquée dans le transport de l'auxine et de nombreux phénotypes du mutant *big* sont effectivement associés à un défaut du transport de cette phytohormone (Gil *et al.* 2001, Ruegger *et al.* 1997). De plus, ce mutant présente un défaut de réponse aux cytokinines (Kanyuka *et al.* 2003), qui avec l'auxine jouent également un rôle dans le contrôle de l'immunité et de la mort cellulaire chez les plantes (Kunikowska *et al.* 2013, Robert-Seilantantz *et al.* 2011). Cependant, aucun dosage de ces hormones chez le mutant *big* n'avait été rapporté dans la littérature.

La quantification des concentrations en auxine et cytokinines a donc été réalisée chez les mutants *somi2* et *mips1 somi2*, ainsi que chez *mips1* et le sauvage Col-0 comme témoins. Comme pour les résultats précédemment obtenus, les mesures sont réalisées sur des feuilles de rosette prélevées 4 jours après transfert en JL. Un prélèvement en JC a également été effectué. Les analyses ont été réalisées par chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse (Plateforme de chimie du végétal – Institut Jean-Pierre Bourgin – INRA).



**Figure 52. Dosage de l'auxine et des cytokinines dans les mutants *mips1*, *somi2* et *mips1 somi2*.**

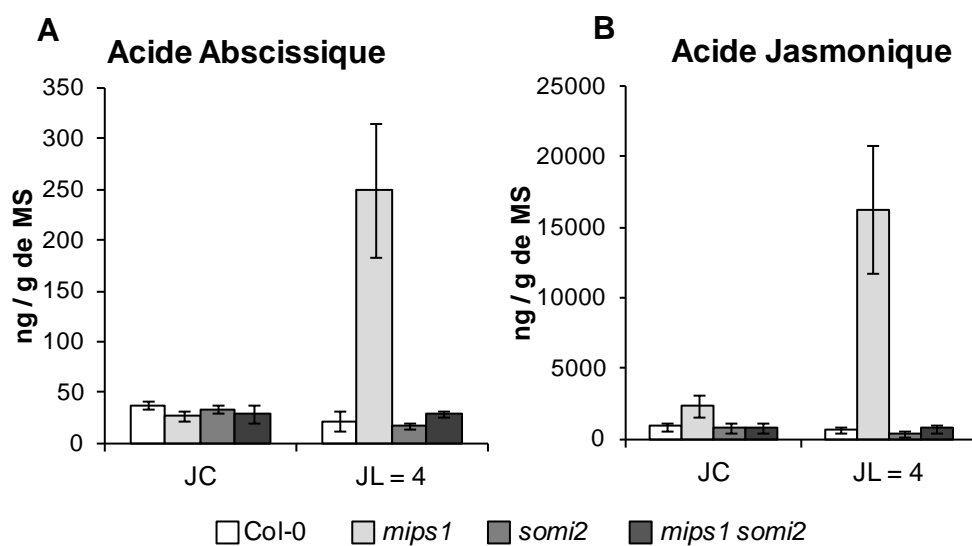
Dosage par chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse de l'auxine (A) et de plusieurs cytokinines (B à F) dans des feuilles de rosettes des génotypes indiqués, en JC et 4 jours après transfert en JL. AIA : Acide-3-Indol Acétique (auxine).

La teneur en auxine (AIA) présente de légères variations entre les phénotypes mais aucune différence significative n'a pu être observée (Figure 52A). De plus, la photopériode ou l'apparition des lésions chez le mutant *mips1* ont peu d'effet sur la concentration de cette hormone dans les feuilles de rosette.

Les cytokinines naturelles sont des hormones dérivées de l'adénine. Les deux formes libres principales, la zéatine et l'isopentyladénine, peuvent se conjuguer à des riboses, des glucoses ou encore des phosphates, créant ainsi une grande diversité de molécules (Sakakibara 2006). Les fonctions moléculaires et cellulaires de chaque cytokinine sont encore floues, cependant, il est admis que les formes libres et certaines des formes conjuguées à des riboses seraient les molécules actives, capables d'induire des voies de signalisation, alors que les molécules conjuguées au glucose seraient des formes de stockage inactives (Sakakibara 2006).

Les Figures 52B à F présentent les teneurs de certaines cytokinines, essentiellement des formes conjuguées (la concentration en zéatine libre, par exemple, était en dessous du seuil de détection). Pour certaines cytokinines (isopentyladénosine, zéatine riboside, et zéatine riboside-5'-monophosphate), les concentrations observées dans les mutants *somi2* et *mips1 somi2* sont inférieures à celles obtenues chez Col-0 en JC (Figures 52B, C et E). En JL, cette différence peut perdurer (isopentyladénosine, zéatine riboside) ou s'estomper (zéatine riboside-5'-monophosphate). Cependant, il semble que l'apparition des lésions en JL induise une forte diminution de la teneur de ces trois cytokinines chez *mips1*. Cette diminution étant partiellement ou totalement restaurée dans le mutant *mips1 somi2* (Figure 52B, C et E). A l'inverse, les teneurs en zéatine-9-Glucoside et en zéatine-o-glucoside sont légèrement augmentées chez *somi2* et *mips1 somi2* en JC, comparé à celles de Col-0 et de *mips1* (Figure 52D et F). En JL, cette différence est toujours observée pour la zéatine-9-glucoside mais disparaît pour la zéatine-o-glucoside. Les teneurs d'autres cytokinines conjuguées ne présentaient pas de variations entre les différents génotypes, que ce soit en JC ou en JL (données non montrées).

La méthode utilisée pour mesurer l'auxine et les cytokinines permettait également d'obtenir une quantification de l'ABA et du JA. Ces deux hormones, agissant dans les réponses aux stress biotiques et abiotiques, n'avaient encore jamais été quantifiées dans le mutant *mips1*. Aucune différence de la teneur en ABA entre les différents génotypes ne peut être observée en JC, alors que l'apparition des lésions chez *mips1*, 4 jours après transfert en JL, est corrélée à une très forte augmentation de cette phytohormone (Figure 53A). La mutation *somi2* supprime totalement cette accumulation dans *mips1 somi2*, et le simple mutant *somi2* présente également une teneur en ABA similaire à celle de Col-0. Des observations comparables peuvent être faites pour le JA en



**Figure 53. Dosage de l'ABA et du JA dans les mutants *mips1*, *somi2*, *mips1 somi2*.**

Dosage par chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse de l'ABA (A) et du JA (B) dans des feuilles de rosettes des génotypes indiqués, en JC et 4 jours après transfert en JL.

JL (Figure 53B). Une légère accumulation de cette hormone est toutefois observée en JC chez *mips1* comparé à Col-0.

*D'après ces résultats, les mutations mips1 et somi2 n'affectent pas la concentration en auxine, mais ont cependant des effets variés et parfois inverses sur les teneurs en cytokinines. De plus, l'ABA et le JA s'accumulent lors de l'apparition des lésions chez mips1 en JL, cette accumulation étant supprimée par la mutation somi2.*

### 3. Discussion et perspectives

La suppression des lésions dans le double mutant *mips1 somi2* permet de mettre en évidence une nouvelle fonction pour le facteur BIG chez Arabidopsis. En plus de son rôle prépondérant dans le développement, cette protéine pourrait être un acteur positif de la MCP. Des croisements avec d'autres LMMs pourront permettre de mieux définir la fonction de BIG dans la MCP, et de tester si son rôle négatif est spécifique aux lésions dépendantes de l'homéostasie du MI comme semble l'indiquer le phénotype du double mutant *mpk4 somi2*. De plus, afin de tester si BIG pourrait être plus largement impliquée dans les réponses immunes, des tests d'interactions plantes-pathogènes pourraient être menés sur les différents mutants *somi2/big*.

Chez le supprimeur *mips1 somi2*, la suppression des lésions ne semble pas être due à une restauration de l'accumulation de MI, contrairement au supprimeur *mips1 hxx1*. Cependant, on ne peut exclure que la quantité de MI mesurée chez *mips1 somi2*, légèrement supérieure à celle de *mips1*, suffise à éliminer l'apparition des lésions.

De manière similaire à *mips1 hxx1*, la mutation *somi2* confère également une suppression partielle de l'accumulation de SA observée chez *mips1*. La protéine BIG agirait avant la production de SA afin de promouvoir la mort cellulaire.

Il semble que la mutation *somi2* n'ait pas d'effet négatif sur la transcription des gènes impliqués dans les réponses immunes, l'induction de la mort cellulaire ou encore les réponses aux stress abiotiques. Au contraire, l'analyse transcriptomique montre que de nombreux gènes impliqués dans ces processus sont surexprimés dans *mips1 somi2*, et dans le simple mutant *somi2*. La suppression du phénotype *mips1* par la désactivation de BIG est alors plus difficile à interpréter. Une hypothèse serait qu'en induisant de manière constitutive, mais faiblement, les réponses de défenses et par conséquent les voies de signalisations antagonistes permettant de contrôler ces réponses, la mutation *somi2* acclimaterait les plantes, qui seraient alors insensibles au signal « pro-mort » induit par la diminution de la teneur en MI.



L'induction de l'expression de cette catégorie de gènes pourrait être liée à l'altération du transport de l'auxine observée dans les mutants *big* (Gil *et al.* 2001). En effet, les voies du SA et de l'auxine sont antagonistes, puisque l'activation des voies de signalisation de l'auxine supprime la biosynthèse et la voie de signalisation du SA (Robert-Seilanianantz *et al.* 2011). De plus, le stress mitochondrial, dont les voies de signalisation seraient antagonistes à celles de l'auxine, est accentué chez le mutant *big* (Ivanova *et al.* 2014). Ceci pourrait également expliquer la surexpression des gènes chez *somi2* et *mips1 somi2*.

Les analyses des teneurs en auxine n'ont pas montré d'anomalie d'accumulation de cette hormone dans les feuilles de rosette des mutants *somi2* et *mips1 somi2* mais on ne peut exclure des défauts de répartition de l'auxine au sein des tissus qui ne pourraient être détectés avec la méthode de dosage global que nous avons utilisée. Une accumulation d'auxine dans certaines cellules pourrait ainsi conduire à l'inhibition de la MCP.

Contrairement à l'auxine, les teneurs de certaines cytokinines sont modifiées dans les mutants *somi2* et *mips1 somi2* en JC et en JL, et également dans le mutant *mips1* lors de l'apparition des lésions. La kinétine et la benzylaminopurine, sont capables d'induire la MCP à de fortes concentrations, alors que la zéatine, n'a aucun effet sur ce processus (Kunikowska *et al.* 2013). Malheureusement, les deux premiers composés étaient présents à des concentrations trop faibles pour pouvoir être correctement quantifiés lors de nos analyses. De plus, en ce qui concerne les conjugués de la zéatine ou de l'isopentyladénine, les différences observées entre les mutants *somi2*, *mips1 somi2* et Col-0 ou *mips1* sont parfois opposées et difficiles à interpréter. Les fonctions propres de chacune des cytokinines et de leur conjugués ne sont pas claires et font l'objet de débats (Hirose *et al.* 2008), de ce fait il est très difficile d'estimer l'impact des variations obtenues sur les phénotypes mutants et sur la régulation de la MCP.

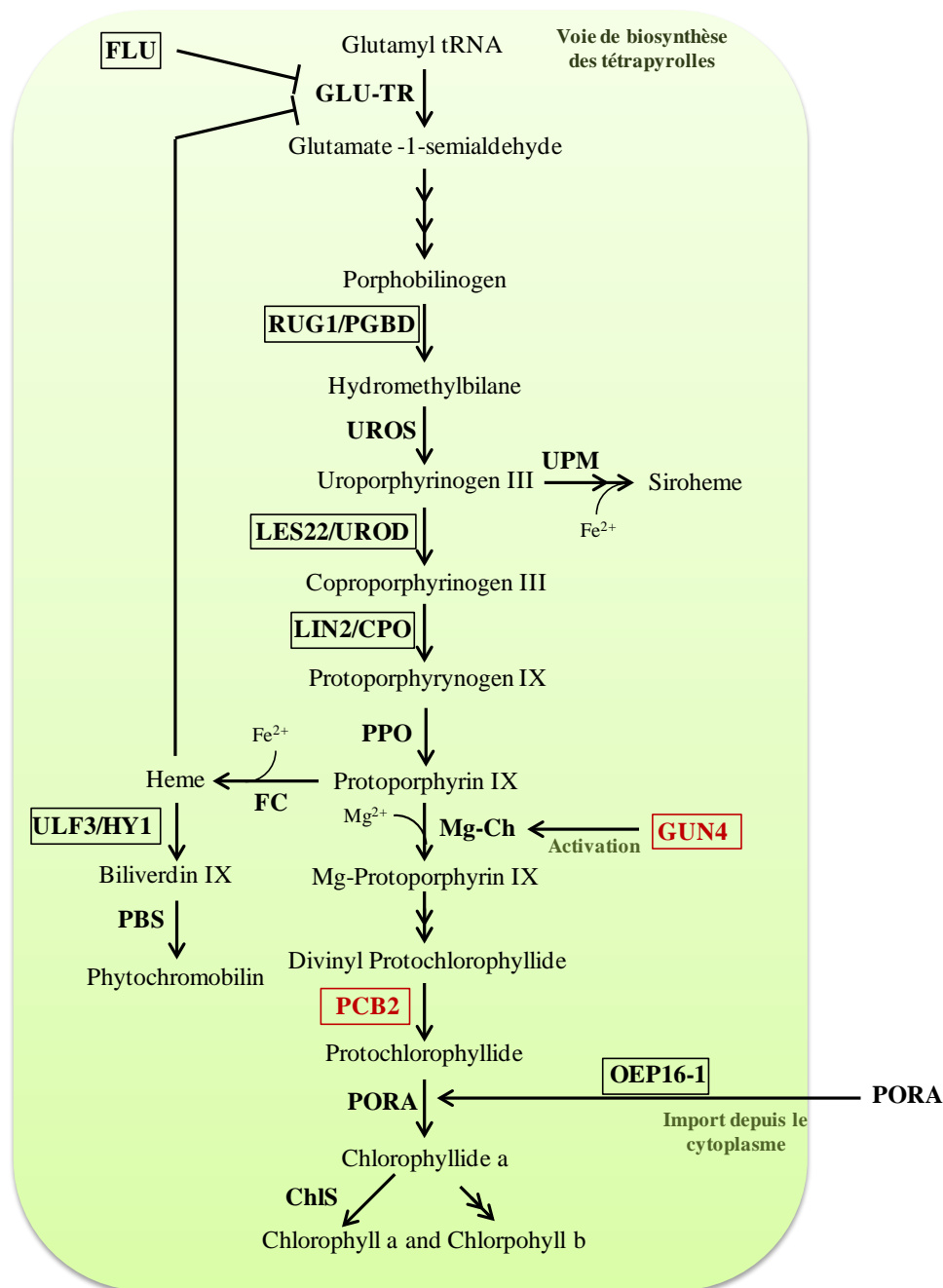
Nous avons également détecté une accumulation de JA et d'ABA chez *mips1* en JL, qui est supprimée par la mutation *somi2*. L'accumulation de ces phytohormones chez *mips1* pourrait être un marqueur de l'état globalement stressé de ce mutant, ou le JA et l'ABA pourraient également être impliqués dans la régulation de la MCP chez ce mutant. Par exemple, les voies du SA et du JA sont antagonistes, une accumulation de JA pourrait ainsi jouer un rôle dans la limitation de l'intensité des lésions et de leur propagation. Un résultat allant dans ce sens, est que le double mutant *mips1 aos* présente une sévérité des lésions accrue comparée à *mips1* (Meng *et al.* 2009). Le mutant *aos* est déficient dans la biosynthèse du JA (Park *et al.* 2002).





En conclusion, nous avons pu identifier un nouvel acteur impliqué dans la régulation de la MCP dépendante du MI. Cependant, ces résultats restent préliminaires et des analyses complémentaires s'avèrent nécessaires pour mieux appréhender les mécanismes cellulaires et moléculaires mis en jeu. Les efforts pourraient se concentrer sur l'étude de la fonction de la protéine BIG, qui reste à l'heure actuelle encore inconnue, sans doute en raison de sa grande taille, rendant sa manipulation difficile. Il serait également pertinent de connaître la localisation subcellulaire de la protéine, ou encore d'identifier des partenaires protéiques. La protéine possède un domaine putatif E3 ubiquitine ligase impliqué dans la reconnaissance de protéines cibles à ubiquitiner, induisant ainsi leur dégradation par le protéasome qui est un acteur majeur de la MCP et des voies de signalisation de certaines phytohormones (Hatsugai *et al.* 2009, Pieterse *et al.* 2012). BIG pourrait donc être impliquée dans la reconnaissance et l'adressage de ces cibles protéiques. Certaines approches, mises au point sur des modèles animaux, permettent d'étudier l'ubiquitination globale des protéines dans les cellules, en utilisant des immunodétections couplées à de la spectrométrie de masse (Xu *et al.* 2010a). Une méthode similaire pourrait être utilisée pour comparer les protéines différentiellement ubiquitinées entre Col-0 et les mutants *somi2*, *mips1 somi2* et *big*.

Des approches de génétiques seraient également envisageables. Les mutants *mips1 somi2* et *somi2* pourraient être croisés avec des lignées impactant la dégradation des protéines par le protéasome, ou avec des lignées affectant les voies de signalisation de l'auxine ou des cytokinines. Pour cela, le suppresseur *mips1 somi2* a été croisé avec le mutant dominant *yucca-ID*, qui suraccumule de l'auxine (Zhao *et al.* 2001). Cependant, des analyses préliminaires suggèrent que la mutation *yucca-ID* n'a pas d'effet sur la mise en place des lésions chez *mips1*, ou ne permet pas d'induire à nouveau le développement de la MCP chez *mips1 somi2*.



**Figure 54. Représentation simplifiée de la voie de biosynthèse des tétrapyrroles.**

Les noms encadrés en noir correspondent aux protéines dont la désactivation conduit à un phénotype de type LMM, sauf pour *ULF3/HY1* dont la désactivation supprime le LMM *flu*. Les noms encadrés en rouge correspondent à des protéines dont la désactivation supprime les lésions chez *mips1*. ChlS : Chlorophyll synthase ; FC : Fe chelatase ; FLU : Fluorescent ; GLU-TR : Glutamyl-tRNA reductase ; GUN4 : Genomes uncoupled 4 ; LES22/UROD : Lesion 22/Uroporphyrinogen III decarboxylase ; LIN2/CPO : Lesion initiation 2/Coproporphyrinogen III oxidase ; Mg-Ch : Mg chelatase ; OEP16-1 : Outer plastid envelope protein 16-1 ; PCB2 : Pale green and chlorophyll b reduced 2 ; PBS : Phytychromobilin synthase ; PORA : NADPH-protophyllide oxidoreductase ; PPO : Protoporphyrinogen IX oxidase ; RUG1/PGBD : Rugosa 1/Porphobilinogen deaminase ; ULF3/HY1 : FLU3 écrit à l'envers/Hème oxygenase 1 ; UPM : Uroporphyrinogen III methylase ; UROS : Uroporphyrinogen III synthase.

## IV. Le suppresseur *mips1 somi3* et les chloroplastes

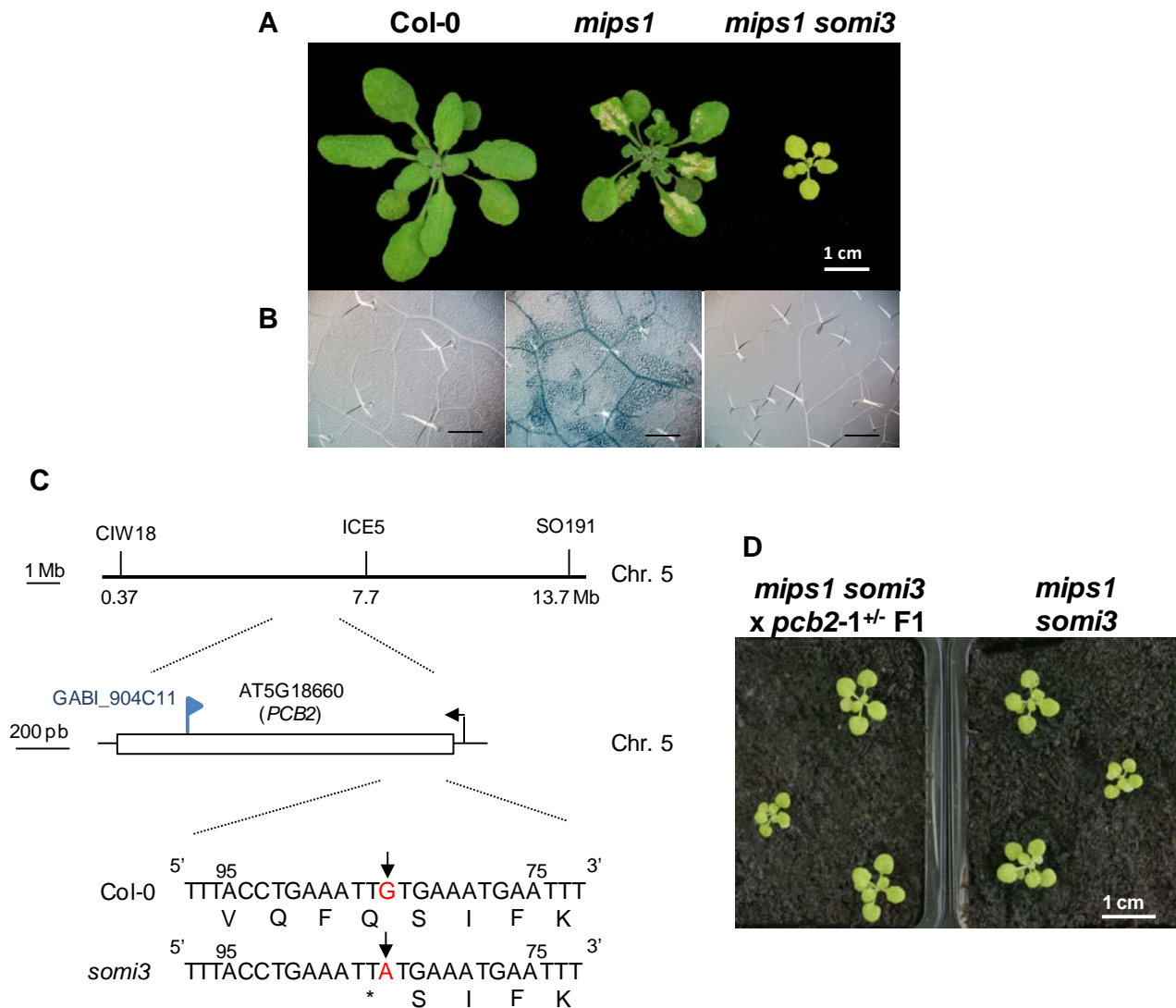
### 1. Introduction

Le troisième et dernier suppresseur issu du crible, dont la caractérisation m'a été confiée, est le suppresseur *mips1 somi3*. Il s'agissait également d'une lignée diploïde avec un déterminisme génétique récessif. En plus d'une suppression totale des lésions, ce suppresseur présente un phénotype supplémentaire de type chlorose qui le distingue des autres suppresseurs et en fait un candidat intéressant.

La mutation *somi3* responsable de la suppression des lésions a également été identifiée par séquençage à haut débit d'un « pool » d'ADN issu de lignées recombinantes. Les séquences obtenues indiquent que *somi3* correspondrait à la substitution d'un nucléotide situé dans le gène *PCB2* (*PALE GREEN AND CHLOROPHYLL B REDUCED 2* ; AT5G18660). L'expérience de complémentation fonctionnelle est encore en cours mais suggère d'ores et déjà que la mutation de ce gène dans *mips1 somi3* est responsable de la suppression des lésions.

Le gène *PCB2* code pour une enzyme divinyl protochlorophyllide 8-vinyl reductase qui catalyse la conversion de la divinyl protochlorophyllide a en monovinyl protochlorophyllide a (Nakanishi *et al.* 2005). La protéine PCB2 catalyse donc une étape de la biosynthèse de la chlorophylle (Figure 54), et une perte de son activité conduit à une diminution drastique de l'accumulation de pigments dans les feuilles, tout particulièrement de chlorophylle b (Nakanishi *et al.* 2005). L'identification de PCB2 comme facteur nécessaire pour l'établissement des lésions chez *mips1*, confirme un précédent résultat du laboratoire montrant que l'inactivation du gène *GUN4* (*GENOMES UNCOUPLED 4*), grâce à un microARN artificiel, conduit à une suppression du phénotype de *mips1* (Meng *et al.* 2009). La protéine GUN4 joue un rôle d'activation du complexe Mg-chelatase catalysant la conversion de la protoporphyrine IX (proto IX) en Mg-protoporphyrine IX (Mg-proto IX) (Adhikari *et al.* 2011), une autre étape de la biosynthèse de la chlorophylle (Figure 54).

Ces deux observations vont dans le même sens, celui du rôle crucial de la voie de biosynthèse des tétrapyrroles (dont la chlorophylle fait partie) dans la régulation de la MCP chez les plantes (§Introduction) (Figure 54), et mettent en avant l'importance des chloroplastes dans le développement des lésions chez *mips1*. Au laboratoire, Cécile Raynaud, chercheuse et directrice de l'équipe, s'intéresse de près à cette problématique et à travers des approches génétiques, essaye de comprendre le rôle des chloroplastes et du signal rétrograde dans l'établissement des lésions chez *mips1*. Dans ce contexte, elle a montré, par une approche gène candidat, que la mutation



**Figure 55. Phénotype du suppresseur *mips1 somi3* et cartographie de la mutation *somi3*.**

Le suppresseur *mips1 somi3* ne présente plus aucune lésion visible 4 jours après transfert en JL (A), ce qui est confirmé par une coloration au bleu de trypan (B). Le suppresseur *mips1 somi3*, dans le fond génétique Col-0, a été croisé avec le mutant *mips1-2*, dans le fond génétique WS. A partir des descendants F2 (avec ou sans lésions) issus de ce croisement, la technique de « Bulk Segregant Analysis » a été utilisée afin de localiser à large échelle la mutation *somi3*, et a permis de la situer sur le chromosome 5, entre les marqueurs CIW18 et ICE5 (C). L'ADN nucléaire de 100 F2 sans lésions a été « poolé » en un seul échantillon qui a été entièrement séquençé par séquençage à haut débit (Illumina Hiseq 2000, entreprise BGI Tech solutions). En utilisant le logiciel CLC genomic worbench et le génome du sauvage Col-0 comme référence (TAIR10), une mutation présente dans 100% des « reads » du gène *PCB2* (AT5G18660) a pu être identifiée (C). La mutation correspond à une substitution qui convertit une glutamine en un stop. Le suppresseur *mips1 somi3* a été croisé avec une lignée hétérozygote *pcb2-1<sup>+/-</sup>* (GABI\_904C11) présentant un ADN-T dans une copie du gène *PCB2*. La moitié des descendants F1 issus de ce croisement présentent un phénotype similaire à *mips1 somi3* (D).

*fryI-6* d'*Arabidopsis*, affectant la biosynthèse du 5'-phosphoadénosine-3'-phosphate (PAP), est également capable de supprimer les lésions chez *mips1*. Ce travail, auquel j'ai participé est l'objet d'une publication en préparation, présentée en Annexe 2.

L'ensemble des analyses présentées par la suite est le fruit de réflexions et de travaux collaboratifs entre C. Raynaud et moi-même. Plus précisément, j'ai employé certaines des compétences acquises lors de ma thèse (dosage du SA, tests de sensibilités à *P. syringae*, extraction pour analyse du métabolome) pour compléter les caractérisations des plantes, et j'ai mis au point les analyses permettant de caractériser le phénotype de *mips1* en présence d'une faible concentration de CO<sub>2</sub>.

## 2. Résultats

### 2.1. Phénotype du supprimeur *mips1 somi3* et cartographie de la mutation *somi3*

Le supprimeur *mips1 somi3* supprime complètement l'apparition des lésions en JL (Figure 55A). De plus, ce mutant présente un retard de croissance sévère, comparé à *mips1* ou Col-0, et un défaut de pigmentation caractérisé par des feuilles vert pâle.

Les mêmes approches de génétique que celles utilisées pour les supprimeurs *mips1 somi1* et *mips1 somi2* ont été utilisées afin de cartographier la mutation *somi3*. La technique de BSA a permis de localiser la mutation en haut du chromosome 5, entre les marqueurs microsatellites CIW8 et ICE5 (Figure 55B). L'analyse du séquençage complet de l'ADN nucléaire provenant d'un « pool » de 100 plantes recombinantes F2 a ensuite révélé une mutation dans le gène *PALE GREEN AND CHLOROPHYLL B REDUCED 2* (*PCB2* ; AT5G18660) (Figure 55B). La mutation de type substitution convertit une glutamine en un stop, très tôt dans la séquence protéique. La protéine PCB2 est impliquée dans la biosynthèse de la chlorophylle en catalysant l'étape permettant la conversion divinyl protochlorophyllide en monovinyl protochlorophyllide (Nakanishi *et al.* 2005). Des caractérisations précédentes, chez *A. thaliana* et *O. sativa*, montrent que des plantes désactivées pour cette protéine possèdent également des feuilles chlorotiques (Nagata *et al.* 2005, Nakanishi *et al.* 2005, Wang *et al.* 2010).

Afin de confirmer que cette mutation est bien responsable de la suppression des lésions dans le mutant *mips1 somi3*, nous avons réalisé un test de complémentation. Pour cela, une lignée d'insertion possédant un ADN-T dans le gène *PCB2* a été commandée, et nommée *pcb2-1* (GABI\_904C11). Les mutants *pcb2-1* homozygotes pour l'insertion étaient complètement albinos



et ne survivaient pas (donnée non présentée). Le suppresseur *mips1 somi3* a donc été croisé avec les plantes *pcb2-1<sup>+/+</sup>*, hétérozygotes et présentant un phénotype identique au sauvage. La moitié des descendants F1 issus de ce croisement étaient de phénotype sauvage tandis que l'autre moitié présentait un phénotype vert pâle, similaire à *mips1 somi3* (Figure 55C). Ce résultat suggère donc que la mutation *somi3* est allélique à *pcb2-1*.

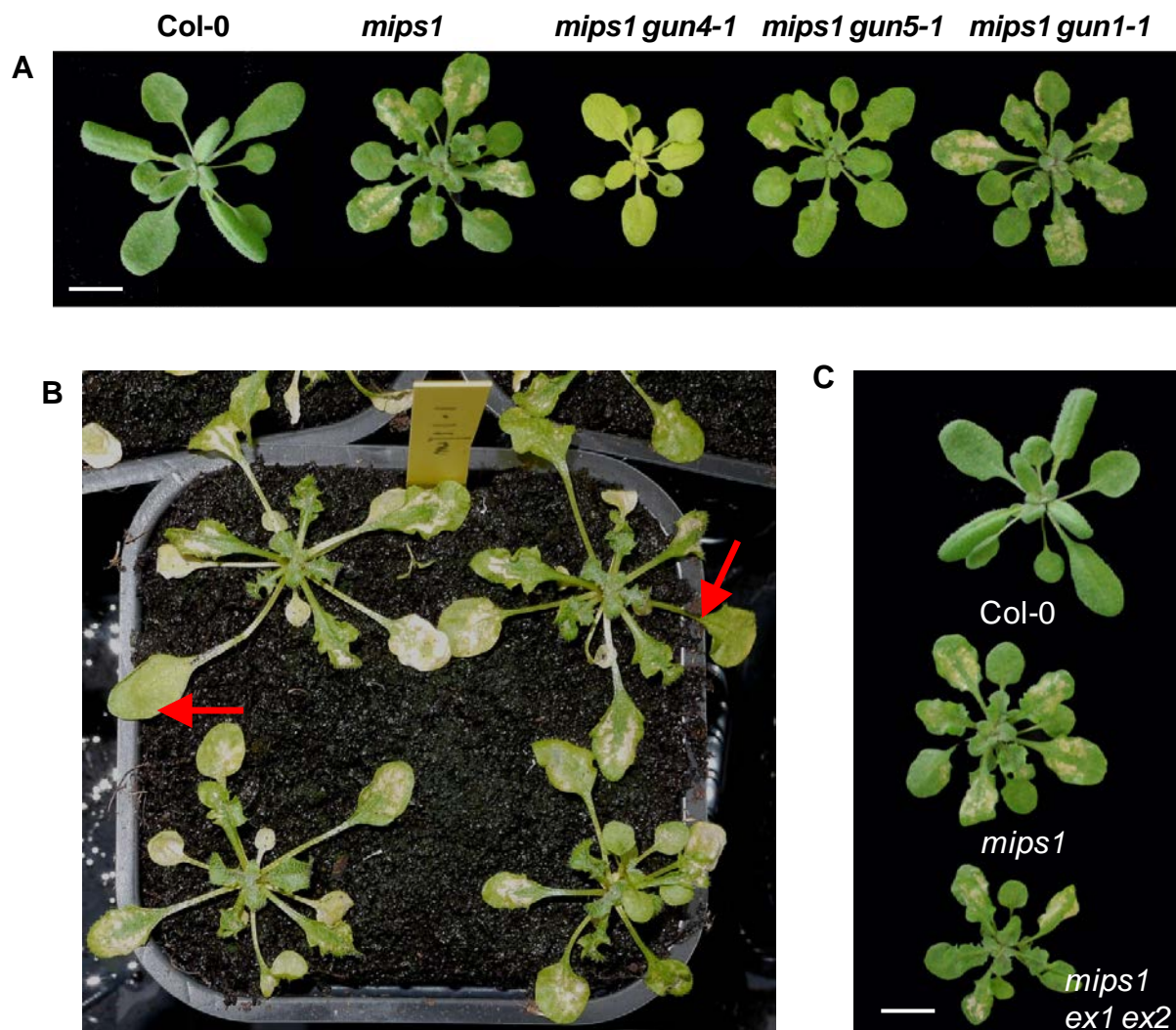
Pour confirmer cela, le suppresseur *mips1 somi3* a été transformé avec une construction possédant l'ADNc sauvage de *PCB2* dont l'expression est sous contrôle du promoteur 35S. Plusieurs plantes T1 indépendantes issues de cette transformation présentaient une restauration des lésions (données non présentées), et la caractérisation des T2 est en cours au laboratoire.

## **2.2. Des chloroplastes fonctionnels sont requis pour le développement des lésions chez *mips1***

L'identification de *PCB2* dans le crible suppresseur va dans le sens de précédents résultats du laboratoire montrant que la désactivation par miARN artificiel du gène *GUN4*, également impliqué dans la biosynthèse de la chlorophylle, permet la suppression des lésions du mutant *mips1* (Meng *et al.* 2009). Ceci suggère un rôle crucial de la voie de biosynthèse des tétrapyrrolles et plus généralement du fonctionnement des chloroplastes dans le développement de la MCP chez *mips1*. Nous avons donc décidé d'étudier de façon plus approfondie cette problématique.

Plusieurs voies de signalisation rétrograde permettent de coordonner les signaux perçus par les chloroplastes et la régulation de l'expression de gènes nucléaires (Chi *et al.* 2013). Dans la voie contrôlée par les protéines GUN, des tétrapyrrolles (hème ou Mg-proto IX) joueraient le rôle de molécules signal (Chi *et al.* 2013). Comme la diminution de l'expression du gène *GUN4* supprime les lésions de *mips1*, il peut être supposé que cette voie rétrograde est nécessaire à la mise en place de la MCP chez *mips1*. Par ailleurs, la sous-expression de *GUN4* chez *mips1* conduit à un défaut de pigmentation et à des feuilles vert pâle (Meng *et al.* 2009). De plus, la protéine *PCB2*, désactivée dans le suppresseur *mips1 somi3*, agit en aval de la Mg-proto IX alors que *GUN4* est impliqué dans la réaction catalysant la synthèse de cette molécule, il est donc peu probable que la désactivation de ces protéines ait des conséquences similaires sur l'accumulation de la Mg-proto IX. Par conséquent, nous pouvons également supposer qu'une teneur correcte en pigments, et donc des chloroplastes fonctionnels, est nécessaire à la mise en place des lésions chez *mips1*.





**Figure 56. La MCP chez *mips1* requiert des chloroplastes fonctionnels et une exposition à la lumière, mais n'est pas médiée par la production d'oxygène singulet.**

Les lésions chez *mips1* sont supprimées ou partiellement supprimées respectivement par les mutations *gun4-1* et *gun5-1* qui altèrent l'accumulation de chlorophylle, mais la mutation *gun1-1*, sans effet sur l'accumulation de la chlorophylle ne permet pas la suppression des lésions (A). Des feuilles de plantes *mips1*, placées en JL, ont été conservées en condition de JC en les recouvrant d'aluminium, ce qui empêche l'apparition des lésions sur ces feuilles (Flèches rouges ; B). Le triple mutant *mips1 ex1 ex2* développe toujours des lésions après transfert en JL, ce qui suggère que l'induction de celles-ci ne dépend pas de l'oxygène singulet (C). Barres sur les photos = 1cm.

Dans le but de trancher entre les deux hypothèses, *mips1* a été croisé avec différentes lignées mutantes désactivées soit pour la protéine GUN1, qui affecte le signal rétrograde mais pas la biosynthèse de la chlorophylle, soit pour GUN4 ou GUN5, toutes deux impliquées dans la biosynthèse de la Mg-proto IX et dans le signal rétrograde (Koussevitzky *et al.* 2007, Mochizuki *et al.* 2001). Le double mutant *mips1 gun1-1* présente un phénotype très similaire au simple mutant *mips1* après transfert en JL alors que le mutant *mips1 gun5-1* présente une légère suppression des lésions, et des feuilles sensiblement plus claires (la mutation *gun5-1* est un allèle faible) (Figure 56A). Le double mutant *mips1 gun4-1* présente une suppression totale des lésions et des feuilles vert pâle (Figure 56A).

*Ces résultats suggèrent une corrélation entre l'intensité des lésions et l'accumulation de chlorophylle. Des chloroplastes fonctionnels, plutôt que la voie de signalisation rétrograde GUN, seraient donc nécessaires au développement de la MCP chez mips1.*

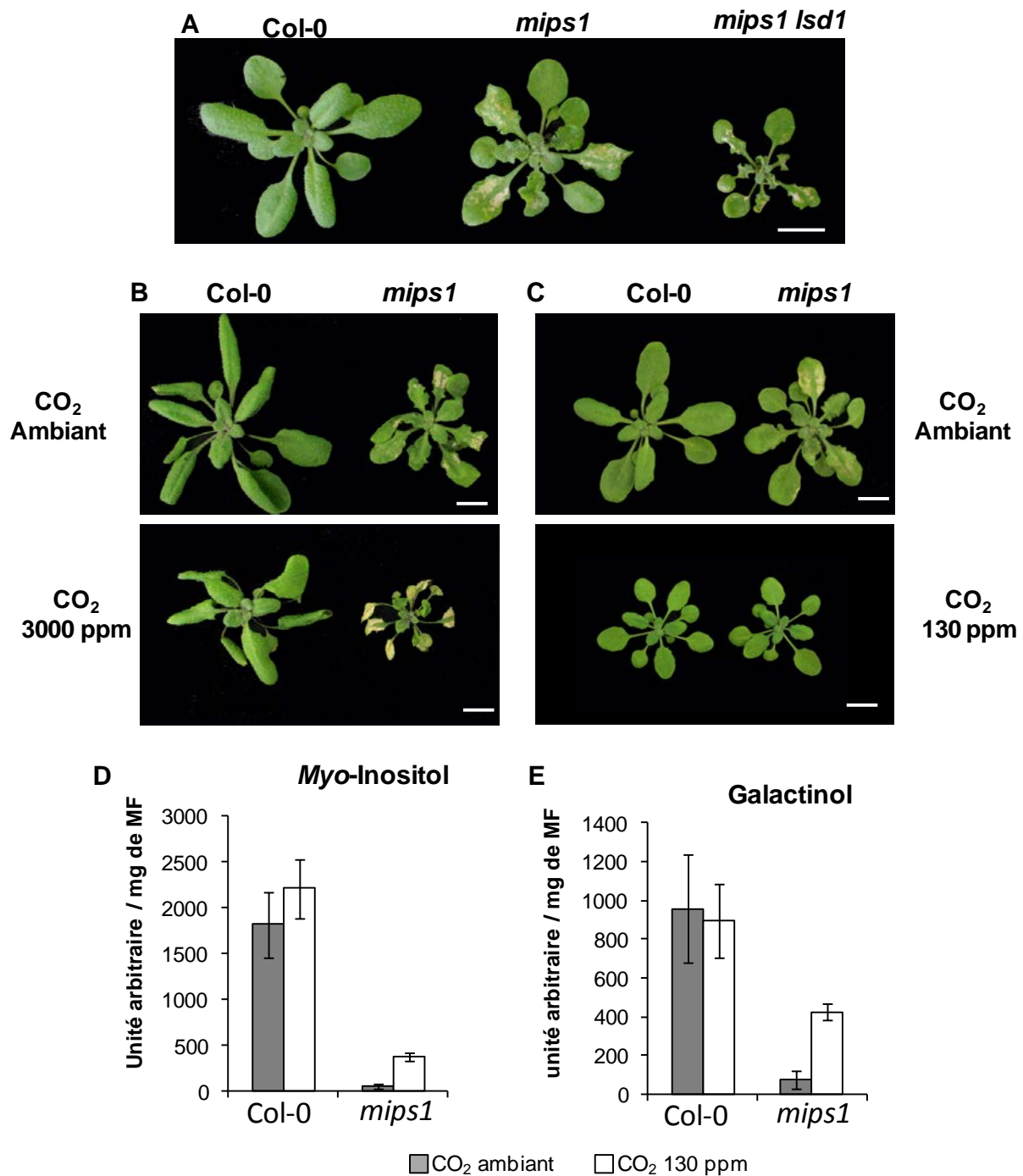
### **2.3. La MCP induite chez *mips1* est contrôlée localement par la lumière**

Le fait que des chloroplastes fonctionnels soient requis pour l'induction de la MCP chez *mips1* laisse supposer que la mort cellulaire pourrait être régulée localement par la lumière chez ce mutant. Pour tester cette hypothèse, plusieurs plantes *mips1* ont été transférées en JL pour induire les lésions, mais sur chaque plante, une feuille a été gardée dans des conditions de JC en la recouvrant d'aluminium. La figure 56B montre que ces feuilles, conservées en JC, ne présentent pas de lésions alors que les autres feuilles des plantes en ont développées. Ceci confirme qu'une exposition locale à la lumière est nécessaire à l'induction de la MCP.

*Nos résultats suggèrent donc que des signaux dépendants de la lumière et produits par les chloroplastes sont responsables de l'induction de la MCP chez mips1, et que bien que ce mutant accumule du SA pouvant fonctionner comme un signal systémique, l'effet de la lumière reste « feuille autonome ».*

### **2.4. La voie rétrograde médiée par EX1/EX2 ne régule pas la MCP chez *mips1***

Une voie de signalisation dépendante des chloroplastes et contrôlant la MCP est médiée par les protéines EXECUTER 1 et 2 (EX1 et 2). Il a été montré que ces deux protéines régulent les réponses conduisant à la MCP dans le LMM *flu*, suite à une accumulation conditionnelle d'oxygène singulet ( $O_2^1$ ) (Lee *et al.* 2007). Le triple mutant *flu ex1 ex2* supprimant le phénotype



**Figure 57. La formation des lésions chez *mips1* dépend de l'activité métabolique des chloroplastes plutôt que du statut redox.**

Le phénotype de *mips1* est augmenté par la mutation *lsd1* (A). La sévérité du phénotype de *mips1* est augmentée si les plantes sont transférées en JL dans des conditions de fort CO<sub>2</sub> (3000ppm ; B). A l'inverse, le transfert des plantes en JL dans des conditions de faible CO<sub>2</sub> (130 ppm), supprime les lésions (C). Les teneurs en myo-inositol (D) et galactinol (E) ont été dosées par GC-MS dans des feuilles de rosettes des génotypes indiquées 4 jours après transfert en JL, en condition de CO<sub>2</sub> ambient ou de faible CO<sub>2</sub> (130ppm). Barres sur les photos = 1cm. ppm : partie par million.

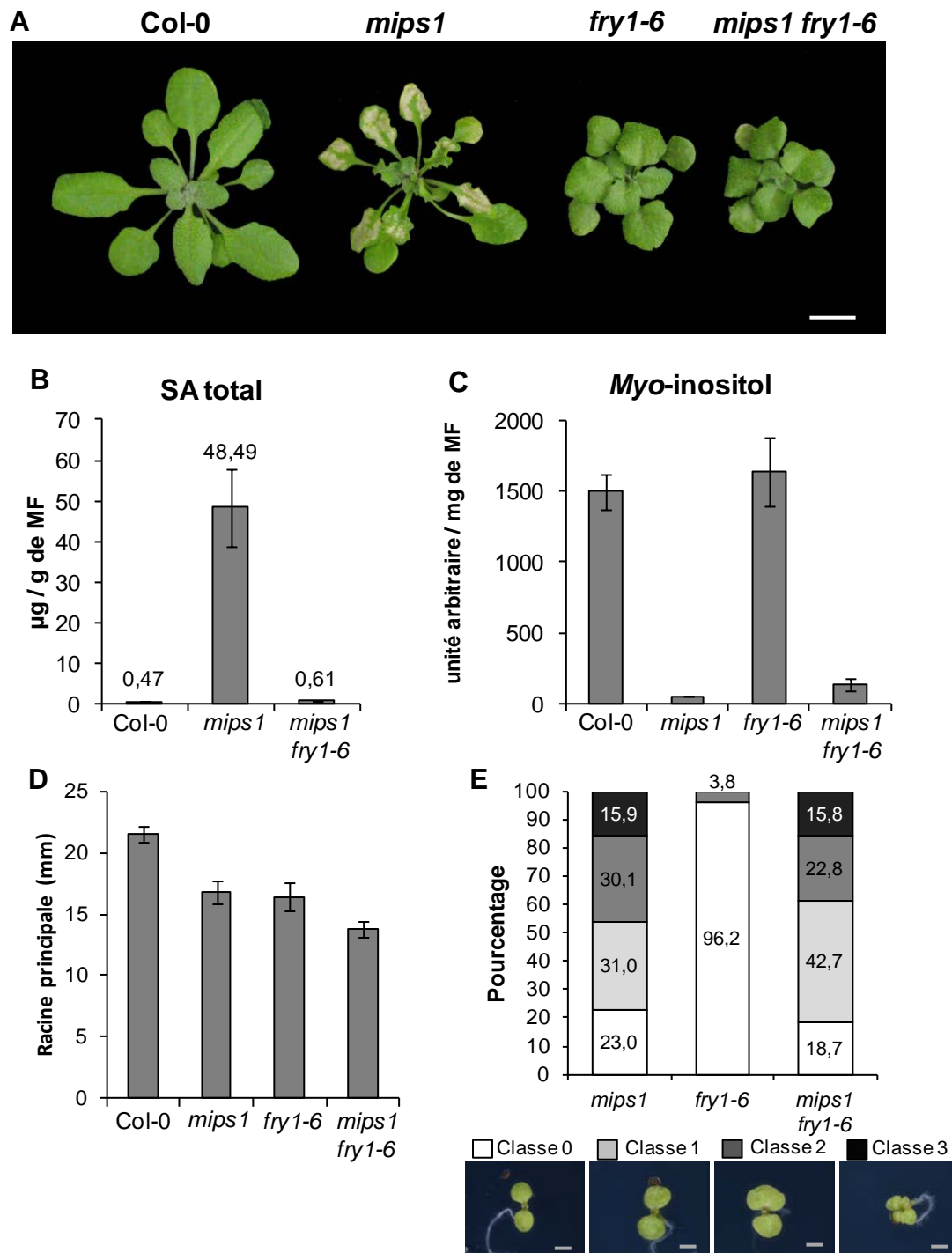
de *flu*, nous avons généré le triple mutant *mips1 ex1 ex2* afin de déterminer si la MCP est réduite dans ce contexte. De manière surprenante, le phénotype du triple mutant est très similaire à celui du simple mutant *mips1* (Figure 56C), ce qui suggère que la production d'O<sub>2</sub><sup>1</sup> n'est pas le signal déclenchant la MCP chez *mips1*.

## 2.5. Les changements redox associés à l'activité des chloroplastes ne sont pas responsables du phénotype de *mips1*

La MCP peut également être induite par un changement du statut redox des plastoquinones quand les plantes sont exposées à une quantité excessive de lumière, et il a été montré que la protéine LSD1 est requise pour le confinement de la mort cellulaire dans ces conditions (Mateo *et al.* 2004). Afin de tester génétiquement si MIPS1 fonctionne dans la même voie, le double mutant *mips1 lsd1* a été obtenu. Il semble que ce mutant soit plus affecté que le simple mutant *mips1* : les lésions apparaissent plus tôt (données non montrées et à confirmer) et la croissance des plantes est réduite (Figure 57A). Cette additivité des phénotypes suggère que les deux protéines fonctionnent dans deux voies de signalisations indépendantes.

La production d'O<sub>2</sub><sup>1</sup> et la réduction des plastoquinones ne sont pas les seuls changements redox associés avec l'activité chloroplastique à la lumière. Par exemple, la photorespiration, qui implique la coopération des chloroplastes, des peroxysomes et des mitochondries, produit aussi du H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. L'analyse du double mutant *mips1 oxt6* a montré que la production de ROS, en particulier de l'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, ne semble pas être augmentée chez *mips1* avant la formation des lésions (§I.2), mais *mips1* pourrait posséder une sensibilité accrue à l'égard des ROS. Pour tester cela, ce mutant a été placé en condition de fort CO<sub>2</sub>, après transfert en JL, pour diminuer la photorespiration et donc la production de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> par les peroxysomes (Queval *et al.* 2007). De manière surprenante, ceci augmente le phénotype de mort cellulaire du mutant *mips1* : comparées aux plantes en condition de CO<sub>2</sub> ambiant, les plantes en fort CO<sub>2</sub> présentent des lésions qui envahissent tout le limbe foliaire, seul le pétiole des feuilles reste intact, et toutes les feuilles semblent affectées (Figure 57B). A l'inverse, la mort cellulaire est supprimée lorsque les mutants *mips1* sont transférés en JL dans des conditions de faible CO<sub>2</sub> (Figure 57C).

Afin de déterminer si les conditions de faible CO<sub>2</sub> peuvent affecter l'accumulation de MI chez *mips1*, ce composé a été quantifié par GC-MS, 4 jours après transfert en JL. Les feuilles du mutant *mips1* en condition de faible CO<sub>2</sub> présentent une accumulation de MI équivalente à 17% de celle de Col-0, alors qu'elle est plus faible en condition de CO<sub>2</sub> ambiant (4% ; Figure 57D). Des observations similaires peuvent être faites pour le galactinol (Figure 57E). Même si nous ne



**Figure 58. Les lésions du mutant *mips1* sont supprimées par la mutation *fry1-6*.**

Le mutant *mips1* a été croisé avec le mutant *fry1-6* (SALK\_020882) et le double mutant ainsi obtenu ne présente plus de lésions 5 jours après transfert en JL (A). Le double mutant *mips1 fry1-6* ne présente plus l'accumulation de SA observée chez *mips1*, 4 jours après transfert en JL (B), mais présente toujours une diminution drastique de la teneur en MI, comparé au sauvage (C). Taille de la racine principale de plantules âgées de 14 jours, pour les génotypes indiqués (D). Les morphologies des cotylédons ont été classées en 4 classes, qui ont été comptabilisées sur des plantules âgées de 10 jours, pour les génotypes indiqués.

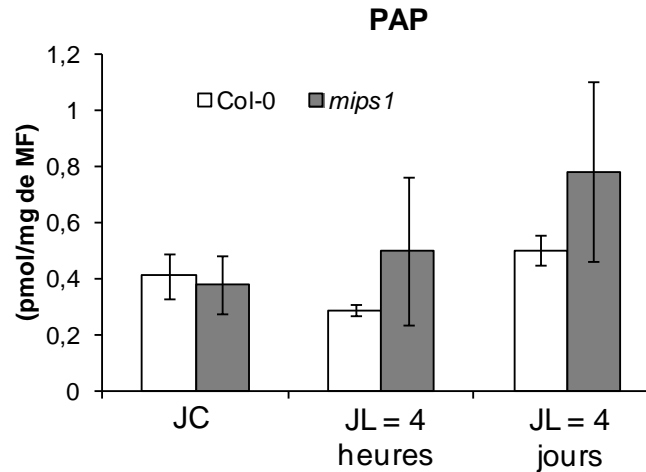
pouvons pas exclure la possibilité que cette légère augmentation de l'accumulation de MI soit suffisante pour supprimer les lésions, la teneur en MI reste très faible chez *mips1* en conditions de faible CO<sub>2</sub>, ce qui suggère que la suppression de la mort cellulaire dans cette condition pourrait être due à un autre mécanisme.

*Ces résultats suggèrent que des changements dans le métabolisme des chloroplastes, plutôt que de l'état redox, sont impliqués dans le développement de la MCP chez mips1.*

## **2.6. La MCP chez *mips1* est supprimée par la voie de signalisation rétrograde du PAP**

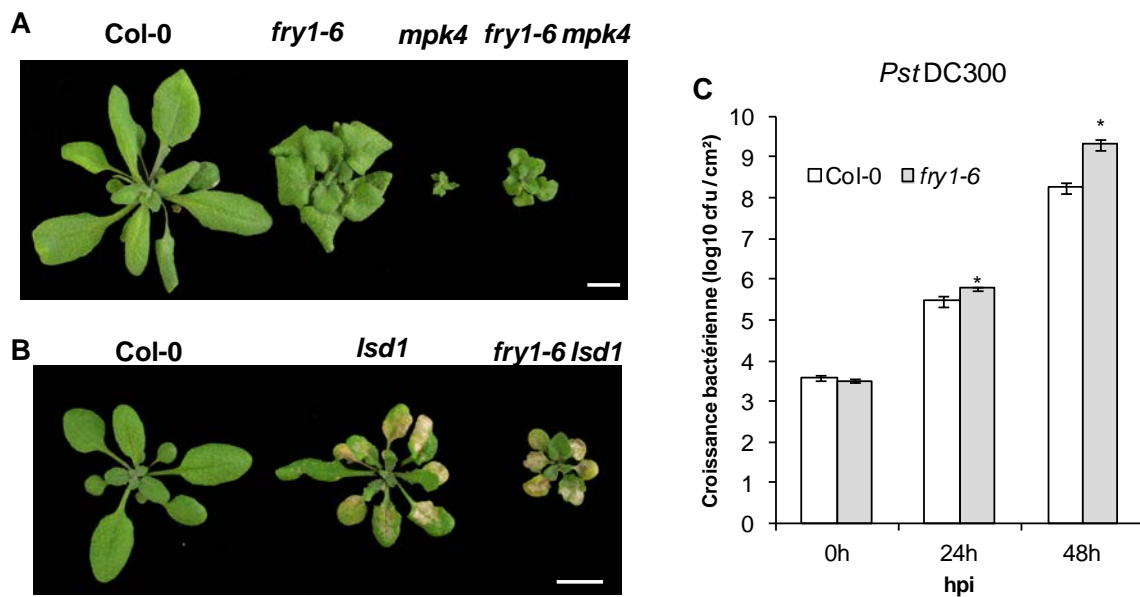
Un métabolite chloroplastique connu pour fonctionner dans la signalisation rétrograde en réponse à la lumière est le 5'-phosphoadénosine-3'-phosphate (PAP). Cette molécule s'accumule en condition de forte luminosité ou de sécheresse, et inhiberait l'activité d'exo-ribonucléases dans le noyau évitant ainsi la dégradation d'ARNm et promouvant les réponses aux stress (Estavillo *et al.* 2011). Le mutant *sal1/fry1/alx8* est désactivé pour l'enzyme catalysant la déphosphorylation du PAP en adénosine monophosphate (AMP), ce qui conduit à une accumulation constitutive de PAP (Estavillo *et al.* 2011). Le mutant d'insertion *fry1-6* (*fiery1-6* ; SALK\_020882) a été croisé avec *mips1* afin de tester le rôle de la signalisation du PAP dans le contrôle de la MCP. Les doubles mutants *mips1 fry1-6* issus de ce croisement présentent une suppression complète des lésions (Figure 58A). Le dosage du SA total 4 jours après transfert en JL montre que l'abolition des lésions dans *mips1 fry1-6* est corrélée à une suppression de l'accumulation de cette phytohormone (Figure 58B) alors que la teneur MI n'est pas restaurée dans le mutant *mips1 fry1-6* (Figure 58C). Ces résultats suggèrent donc que la mutation *fry1-6* agit en aval de la production du MI et en amont de l'accumulation de SA.

L'effet de la mutation *fry1-6* sur les anomalies racinaires et cotylédonaires observées chez *mips1* a également été testé. Par rapport au sauvage Col-0, la taille de la racine principale des simples mutants *mips1* et *fry1-6* est réduite, et celle du double mutant *mips1 fry1-6* l'est encore plus (Figure 58D). Ceci suggère un effet additif des deux mutations. Afin d'analyser la morphologie des cotylédons dans les différents génotypes, 4 classes ont été définies en fonction de la sévérité des phénotypes, et la proportion de chacune de ces classes a été mesurée (Figure 58E). Le mutant *mips1 fry1-6* présente des proportions similaires au mutant *mips1* pour chaque classe (Figure 58E).



**Figure 59. Dosage du PAP après transfert en JL.**

Le dosage du PAP a été effectué à partir de feuilles de rosettes de plantes Col-0 et *mips1* cultivées en JC, 4 heures après transfert en JL (JL= 4 heures) et 4 jours après transfert en JL (JL = 4jours). MF= matière fraîche.



**Figure 60. Implication de la mutation *fry1-6* dans le phénotype des LMM *mpk4* et *lsd1*, et dans la résistance à *P. syringae*.**

La mutation *fry1-6* permet une suppression partielle du phénotype du mutant *mpk4* (A), mais ne permet pas la suppression des lésions se développant chez *lsd1* (B). La sensibilité du mutant *fry1-6* à la bactérie virulente *Pseudomonas syringae* pv *tomato* DC3000 a été testée (C). Les astérisques représentent les différences significatives (Test de Wilcoxon, P value < 0,01). Barres sur les photos = 1 cm. hpi : heures post-inoculation.

*La mutation *fry1-6* supprime donc spécifiquement les lésions se développant en JL chez *mips1*. Cette suppression agissant en amont de l'accumulation de SA ne peut s'expliquer par une restauration de la production de MI.*

## **2.7. La signalisation PAP chez *mips1***

Une hypothèse simple pouvant expliquer le rôle de la signalisation du PAP dans la MCP chez *mips1*, serait que le transfert en condition de JL induise une accumulation de PAP chez le sauvage pour faire face à ces nouvelles conditions lumineuses, et que *mips1* soit déficient pour cette régulation. En collaboration avec le laboratoire du Dr KX Chan (Centre of Excellence in Plant Energy Biology, The Australian National University, Canberra, Australie), le dosage de cette molécule dans des feuilles de rosette a donc été réalisé chez *mips1* et Col-0 en JC et après transfert en JL. Que ce soit en JC, quelques heures après transfert en JL ou 4 jours après transfert en JL, le teneur en PAP n'est pas significativement différente entre *mips1* et Col-0 (Figure 59).

## **2.8. Implication de la mutation *fry1-6* dans le phénotype d'autres LMM et dans les réponses immunes**

Dans le but de tester si la mutation *fry1-6* est un supprimeur général de la MCP ou si son effet est spécifique de la voie de MIPS1, le mutant *fry1-6* a été croisé avec les LMM *lsd1* et *mpk4*. La mutation *fry1-6* supprime partiellement le phénotype du mutant *mpk4*, mais n'empêche pas l'apparition des lésions induites par la mutation *lsd1* (Figure 60A et B).

La protéine MPK4 régulerait l'expression de *MIPS1* en réponse à la flagelline, un peptide bactérien (Latrasse *et al.* 2013). La résistance du mutant *fry1-6* en réponse à la bactérie *Pseudomonas syringae* pv *tomato* DC3000 a donc été testée. La figure 60C montre que 24h et 48h après infiltration de la bactérie, le mutant *fry1-6* présente une sensibilité augmentée à ce pathogène, comparé à Col-0.

*Bien que l'accumulation constitutive de PAP dans le mutant *fry1-6* permette une meilleure tolérance aux stress abiotiques, celle-ci a, au contraire, un impact négatif sur la mort cellulaire et les mécanismes de défenses.*





### 3. Discussion et perspectives

Dans les analyses présentées ci-dessus, nous avons examiné comment les chloroplastes contribuent au développement de la MCP spontanée chez *mips1*, et montré qu'une capacité photosynthétique suffisante des plantes serait requise pour induire la mort cellulaire en absence de MI. Des observations similaires ont été réalisées pour certains LMM, mais les mécanismes sous-jacents divergent d'un mutant à l'autre. Par exemple, chez *lsd1* la mort cellulaire est induite en réponse à un changement du statut redox des plastoquinones, et celle-ci peut être supprimée par une diminution de l'accumulation de la chlorophylle (Mateo *et al.* 2004). Le fait qu'une diminution de la teneur en chlorophylle dans le supprimeur *mips1 somi3* ou dans *mips1 gun4* supprime également les lésions se développant normalement chez *mips1*, suggère un rôle des chloroplastes dans ce processus, bien que les mécanismes soient probablement différents de ceux décrits chez *lsd1*. En effet, l'analyse génétique a montré que MIPS1 et LSD1 agissent dans des voies de signalisations différentes, suggérant que des changements dans le statut redox des plastoquinones n'est pas le signal induisant la mort cellulaire chez *mips1*. Ce constat est renforcé par le fait que le phénotype de *mips1* est plus sévère en condition de fort CO<sub>2</sub>, alors que cette même condition supprime le phénotype de *lsd1* (Mateo *et al.* 2004).

Une autre voie de signalisation impliquant les chloroplastes dans la régulation de la MCP chez les plantes est médiée par les protéines EX1 et EX2 qui induisent la dégradation des chloroplastes et les réponses nucléaires conduisant à la mort cellulaire en cas de production d'O<sub>2</sub><sup>1</sup> (Kim *et al.* 2012, Lee *et al.* 2007). Cependant, l'analyse du triple mutant *mips1 ex1 ex2* montre que cette voie n'est pas impliquée dans la mort cellulaire chez *mips1*, ce qui met en évidence le fait que plusieurs voies de signalisation rétrogrades impliquées dans la régulation de la MCP pourraient co-exister chez les plantes.

De manière inattendue, le phénotype de *mips1* n'est pas corrélé à l'intensité de la photorespiration mais au contraire est supprimé en condition de faible CO<sub>2</sub> et accentué sous fort CO<sub>2</sub>, mettant en avant un effet métabolique. Cependant nous ne pouvons pas exclure que la légère augmentation de la teneur en MI en faible CO<sub>2</sub> soit suffisante pour éviter la mort cellulaire. Pour pouvoir répondre à cette question, il sera possible d'utiliser le sesqui-mutant *mips1 mips2<sup>+/-</sup>*, qui en théorie devrait avoir une capacité de synthèse du MI encore inférieure à celle du simple mutant *mips1*. En effet, le triple mutant *mips1 mips2<sup>+/-</sup> hxk1-1* ne restaure plus la teneur en MI observée dans le supprimeur *mips1 hxk1-1* (§II.2). Le développement des lésions sur *mips1 mips2<sup>+/-</sup>* en faible CO<sub>2</sub> ainsi que la teneur en MI dans cette condition pourraient être testés.



Dans le cas où la condition de faible CO<sub>2</sub> ne supprimerait pas les lésions en raison d'une restauration d'une teneur suffisante en MI, ceci indiquerait alors que des métabolites chloroplastiques sont impliqués dans le déclenchement de la MCP chez *mips1*. Il est connu que des molécules provenant du métabolisme primaire ou secondaire agissent en tant qu'éléments de la signalisation rétrograde. Par exemple, lorsque les plantes sont transférées de conditions de faible à forte luminosité, le transport de trioses-phosphates vers le cytoplasme jouerait un rôle dans l'activation d'une cascade de signalisation impliquant la MAP kinase 6 et conduisant à des changements de l'expression des gènes nucléaires (Vogel *et al.* 2014). De nombreux autres métabolites provenant des plastes sont également impliqués dans la régulation des réponses des plantes face aux stress abiotiques (Xiao *et al.* 2013). Parmi eux, le PAP joue un rôle dans la tolérance à la forte luminosité et la sécheresse (Estavillo *et al.* 2011). Nos résultats montrent que l'accumulation de PAP supprime complètement le développement des lésions dans le mutant *mips1 fry1-6*, et supprime partiellement le nanisme de *mpk4*, mais ne supprime pas la formation des lésions provoquée par la mutation *lsd1*. Ceci indique que la suraccumulation de PAP ne serait pas antagoniste à tous les types de mort cellulaire, mais s'opposerait plutôt aux réponses ayant lieu chez *mips1* lors du transfert en JL. Cependant, aucune modification significative de l'accumulation de PAP n'a pu être observée chez *mips1*, comparé à Col-0, suggérant que FRY1 ne fonctionnerait pas directement en aval de l'accumulation de MI pour réguler la mort cellulaire, mais agirait sur des mécanismes dérégulés chez *mips1* via une voie de signalisation indépendante.

De nouvelles expérimentations sont donc nécessaires afin de comprendre les mécanismes moléculaires qui conduisent à la suppression des lésions en cas d'accumulation de PAP. Il est supposé que cette molécule inhiberait l'action d'exo-ribonucléases dans le noyau et le cytoplasme, telles que les protéines XRN2, 3 et 4 (eXo-RiboNucléases 2, 3 et 4), ce qui d'induirait des réponses pour faire face aux stress (Estavillo *et al.* 2011). Le mutant *mips1* a été croisé avec différentes lignées désactivées pour ces protéines XRN, et l'obtention des différentes combinaisons de doubles, triples et quadruples mutants est en cours au laboratoire. Des résultats préliminaires suggèrent que l'absence d'une ou plusieurs protéines XRN a un effet négatif sur le développement des lésions dans le fond génétique *mips1*, suggérant ainsi que l'inhibition de ces protéines par l'accumulation de PAP serait en partie responsable de la suppression des lésions chez *mips1 fry1-6*.

Si ces résultats se confirment, ce travail et l'étude de la protéine CPSF30 mettent en avant la contribution de mécanismes de régulation post-transcriptionnelle dans le contrôle de la MCP et de l'immunité chez les plantes.



## CONCLUSION GENERALE



### **Le crible de supprimeurs : une approche intéressante ?**

Dans le but de comprendre les mécanismes régulant l'induction de la MCP chez le mutant *mips1*, l'une des stratégies du laboratoire fut d'identifier des facteurs régulant positivement ce processus à travers une approche sans *a priori* de recherche de supprimeurs, par une mutagenèse secondaire. Cette stratégie, souvent pertinente, peut aboutir à l'identification de facteurs dont la fonction est encore inconnue, ou dont l'implication dans le processus étudié serait insoupçonnée.

Dans ce sens, mon travail de thèse a été fructueux puisqu'il a permis de confirmer ou de révéler l'implication de plusieurs protéines dans le contrôle de la MCP, tels que :

- Le rôle de HXK1 dans la régulation de la biosynthèse du MI, impactant ainsi la MCP chez *mips1*.
- Le rôle de BIG, dont la fonction cellulaire et moléculaire reste encore inconnue, notamment face aux réponses aux stress. Son implication dans le transport de l'auxine met également en évidence une fonction probable de cette phytohormone dans la régulation de la MCP chez *mips1*.
- Le rôle de PCB2 et par conséquent des chloroplastes et de l'activité photosynthétique dans la perception du signal lumineux nécessaire à l'induction de la MCP chez *mips1*.
- Le rôle majeur de CPSF30 dans la MCP et dans les réponses immunes, soulignant ainsi l'importance de mécanismes comme la maturation des ARNm dans la régulation de l'expression des gènes impliqués dans les réponses de défenses et dans la mort cellulaire.

Ainsi, l'identification et l'analyse de supprimeurs du mutant *mips1* a permis de mettre en avant différents mécanismes impliqués dans la régulation de la MCP dépendante de l'accumulation du MI qui agissent plus ou moins directement, ou en parallèle de la voie régulée par MIPS1. Cependant, bien que de nouveaux effecteurs aient été identifiés, cela ne nous a pas permis de répondre à une question essentielle :

### **Quelle est la cause de l'induction massive de MCP chez *mips1* ?**

Nous avons pu confirmer que le fonctionnement correct des chloroplastes est essentiel pour promouvoir la mort cellulaire, expliquant ainsi la dépendance du phénotype à l'intensité lumineuse reçue ou à la concentration en CO<sub>2</sub> dans l'air. De plus, il semble que des changements de l'état redox de ces organites ou de la cellule, ne soient pas des signaux promouvant les lésions chez *mips1*. En faisant le parallèle avec la teneur en MI chez *mips1* et la fonction de ce composé dans la cellule, nous pouvons imaginer les scénarios suivants :





- Le MI pourrait se lier à certaines molécules, que nous nommerons molécules X. Puisque chez *mips1*, la quantité de MI est faible, ces molécules X non liées au MI pourraient s'accumuler, ce qui serait toxique ou provoquerait indirectement un programme de mort cellulaire.
- La synthèse de ces molécules X dépend de l'activité photosynthétique et utilise les photosynthétats produits par les chloroplastes. Ceci pourrait expliquer l'implication de ces organites et de la lumière dans la régulation du phénotype de MCP chez *mips1*. En condition de faible luminosité, de JC ou de faible CO<sub>2</sub>, l'activité photosynthétique reste peu élevée ou reste d'une courte durée. Ainsi la synthèse des molécules X est faible et le peu de MI présent chez *mips1* suffit à produire les composés dérivant de la liaison du MI et de ces molécules X. En cas de forte luminosité, de JL ou de forte concentration en CO<sub>2</sub>, la synthèse de ces molécules X est plus forte, mais chez *mips1* la quantité de MI ne suffit pas à lier toutes les molécules X, ce qui conduit à l'accumulation de ces composés.

Le MI est à l'origine de nombreux dérivés dans la cellule, et il est possible que l'induction de la MCP soit due à une accumulation globale de nombreux composés. L'identification de ces molécules X peut donc s'avérer compliquée, leur nombre pouvant être considérable. Cependant, les sphingolipides pourraient être aussi de bons candidats. En effet, l'accumulation de céramides ou de sphingosines, des sphingolipides, est un signal bien connu induisant la mort cellulaire. Le MI peut se lier aux céramides, formant ainsi des inositolphosphocéramides ne possédant plus la capacité d'induire la MCP (Berkey *et al.* 2012). De plus, la biosynthèse des sphingolipides utilise des composés carbonés dérivant des photosynthétats produits par les chloroplastes (Sperling and Heinz 2003). Le dosage des céramides chez *mips1* a déjà été effectué et indiquait une accumulation de ces composés, comparé au type sauvage (Donahue *et al.* 2010). Cependant, dans cette étude, les dosages ont été effectués uniquement en condition restrictive, et des données obtenues en condition permissive seraient nécessaires. En effet, si aucune accumulation de céramide n'est observée en JC, cela appuierait un peu plus l'hypothèse du rôle de ces composés dans l'induction de la MCP chez *mips1*. Des analyses génétiques pourraient également être menées. Par exemple, il serait aisé de croiser *mips1* avec le mutant *fumosineB1 resistant 11* (*fbr11*), désactivé pour une enzyme impliquée dans la biosynthèse des sphingolipides (Shi *et al.* 2007). Ce mutant est insensible à la mycotoxine fumosine B1, qui induit la mort cellulaire des cellules végétales en provoquant l'accumulation de sphingolipides.



### **L'accumulation de SA, un point de non retour ?**

Une forte accumulation de SA est nécessaire au développement des lésions chez *mips1*. L'induction des réponses médiées par cette phytohormone nécessite l'action de nombreuses protéines au sein de sa voie de signalisation. Nous aurions donc pu nous attendre à identifier un composant de la voie du SA dans le crible suppressor. Cependant, même s'il faut considérer que tous les suppressors n'ont pas été analysés, ce ne fut pas le cas. De plus, à chaque fois que la teneur en SA a été mesurée dans les lignées supprimant les lésions (*mips1 somi1*, *mips1 somi2*, *mips1 oxt6*, *mips1 fry1-6*), nous avons pu observer une abolition de l'accumulation de SA survenant normalement chez *mips1*. Ces données suggèrent que la forte production de SA est un point de non retour conduisant irrémédiablement au développement des lésions chez *mips1*. Dans le but d'identifier malgré tout des facteurs agissant en aval de l'accumulation de SA, et en amont de la MCP, il serait possible de réaliser une quantification systématique de cette phytohormone dans d'autres suppressors et de caractériser les éventuels mutants présentant toujours cette accumulation. Cette approche pourrait ainsi permettre d'identifier des effecteurs de la MCP chez *mips1*, des protéines impliquées dans la dégradation des composants cellulaires et la mort de la cellule. Ce qui nous amène à la question suivante :

### **Quels sont les acteurs de la MCP chez *mips1* ?**

Des approches génétiques, cytologiques et biochimiques pourraient permettre de mieux caractériser la MCP en elle-même chez *mips1*, et par conséquent chez les plantes. Il pourrait s'agir par exemple, d'expériences permettant de détecter des activités de type caspase, de visualiser le comportement de la vacuole (il y a-t-il lyse du tonoplaste ou fusion avec la membrane plasmique ?), ou encore le croisement de *mips1* avec des lignées désactivées, ou surexprimant, des effecteurs déjà connus de la MCP chez les plantes (BI-1, VPE, PBA-1...). Dans ce but, le mutant *mips1* a été croisé avec les lignées *mc1* et *mc2*, mutées pour les gènes codant les Métacaspases 1 et 2 (MC1 et 2), des protéases probablement impliquées dans la dégradation des composants cellulaires lors de la MCP (Tsiatsiani *et al.* 2011). Une étude avait montré que la mutation *mc1* supprimait les lésions du mutant *lsd1*, et que, au contraire, la mutation *mc2* augmentait la propagation des lésions (Coll *et al.* 2010). Cependant, les doubles mutants *mips1 mc1* et *mips1 mc2* présentaient des phénotypes similaires au simple mutant *mips1* (Données non montrées). Ceci suggère que ces deux protéases ne jouent pas un rôle important dans la mise en place des lésions chez *mips1*. Il faut noter que le facteur BIG, dont la mutation supprime les lésions dans le suppressor *mips1 somi2*, possède un domaine ubiquitine E3 ligase impliqué dans la



polyubiquitination des protéines et leur adressage au protéasome. Cette protéine pourrait donc jouer un rôle dans la dégradation des protéines au cours de la MCP chez *mips1*. Cependant, la suppression de l'accumulation de SA dans *mips1 somi2* ne va pas dans ce sens, et suggère plutôt un rôle de BIG en amont de la signalisation SA.

### Qu'en est-il des autres phénotypes de *mips1* ?

Un autre fait marquant, est que bien que mutés dans des gènes impliqués dans des processus différents, tous les supprimeurs suppriment les lésions chez *mips1*, mais aucun ne permet de restaurer une racine principale aussi longue que celle du sauvage. Ceci étaye l'hypothèse que le phénotype de racine plus courte et celui du développement des lésions ont pour origine des perturbations différentes. Il est supposé que les défauts racinaires chez *mips1* soient dus à une mauvaise répartition de l'auxine, suite à une altération de trafic membranaire qui provoque une localisation non polarisée des transporteurs PIN (Chen and Xiong 2011, Luo *et al.* 2011). D'autres analyses pourraient être menées pour mieux élucider les mécanismes à l'origine du raccourcissement de la racine chez *mips1*. Par exemple, l'identification de nouveaux facteurs agissant positivement sur ce phénotype pourrait être obtenue grâce à un crible supprimeur.

Le mutant *mips1* présente également des anomalies cotylédonaire dues à des altérations du développement de ces organes lors de l'embryogenèse. Il a été proposé que des mécanismes semblables à ceux impliqués dans les anomalies racinaires soient responsables de ce phénotype (Luo *et al.* 2014). Ceci suggère également que le phénotype des cotylédons et celui du développement des lésions aient pour origine des perturbations différentes. Cependant, des indices laissent penser, qu'au contraire, des mécanismes communs rentrent en jeu. En effet, tout comme pour les lésions, la sévérité des anomalies cotylédonaire chez *mips1* est proportionnelle à l'intensité lumineuse (Luo *et al.* 2011). De plus, le double mutant *mips1 oxt6* montre une forte suppression du phénotype des cotylédons, alors que la taille de la racine reste aussi courte que celle de *mips1*. Nous pouvons donc supposer que les anomalies cotylédonaire soient dues à des effets similaires à ceux se déroulant lors de la mise en place des lésions, et que ces réponses impliquent également des protéines codées par des gènes dont l'expression est régulée par CPSF30. Les protéines BIG, FRY1 et HXK1 seraient impliquées plus spécifiquement dans les mécanismes régulant la MCP qui a lieu dans les feuilles du mutant *mips1*, puisque leur désactivation ne permet pas une suppression du phénotype des cotylédons.



Pour conclure sur l'ensemble de ce travail, un regard critique pourrait considérer que le choix de mener de front l'étude de plusieurs supresseurs en parallèle se fit au dépend d'une caractérisation vraiment approfondie aux niveaux biochimique et/ou moléculaire d'un de ces supresseurs pour comprendre plus finement les processus impliqués. Il reste cependant difficile d'augurer des mécanismes qui auraient pu être découverts si cette option avait été adoptée dès le début de la thèse. Dans tous les cas, cela souligne également la nécessité de moyens techniques et humains afin de mener à bien et de valoriser un tel projet.

Néanmoins, si des choix futurs doivent être faits, il me paraît pertinent de focaliser aujourd'hui la suite de ce travail sur le facteur CPSF30, identifié par l'approche gène candidat. En effet, l'étude de la fonction de cette protéine dans la MCP chez *mips1* a révélé qu'elle serait beaucoup plus largement impliquée dans la mort cellulaire et les réponses immunes. Ceci mettant ainsi en avant le rôle encore peu connu chez les plantes de la maturation des ARNm dans la régulation des réponses de défense. La compréhension de ces mécanismes ne fait que commencer, et cette découverte ouvre la porte à de futurs projets prometteurs. De plus, au regard de son implication dans l'immunité, l'étude de CPSF30 chez des plantes cultivées serait très intéressante et permet d'envisager la possibilité d'applications d'intérêt agronomique.





## MATERIEL ET METHODES



# I. Matériel

## 1. Matériel végétal

L'ensemble des travaux de ma thèse a été réalisé sur l'espèce *Arabidopsis thaliana*. La majorité des lignées mutantes et transgéniques sont dans le fond génétique Columbia-0 (Col-0). Certaines lignées mutantes sont dans le fond génétique Wassilewskija (Ws). L'ensemble des lignées d'insertion utilisées au cours de ma thèse sont indiquées dans le tableau 4. La plupart ont été commandées à des banques publiques de mutants (Alonso *et al.* 2002). Les simples mutants ont été croisés entre eux pour obtenir les doubles, ou triples mutants mentionnés dans les résultats.

## 2. Souches bactériennes

### 1.1. Pour le clonage

L'espèce bactérienne utilisée pour les expériences de clonage est *Escherichia coli*, de souche DH5 $\alpha$  : [F<sup>+</sup>/endA1 hsdR17 (r<sub>k</sub><sup>-</sup>, m<sub>k</sub><sup>+</sup>) supE44 thi-1] recA1 gyrA(Nal<sup>r</sup>) relA1  $\Delta$ (lacZYA-argF) U169 deoR ( $\phi$ 80dlac $\Delta$ (lacZ) M15).

### 1.2. Pour la transformation des plantes

*Agrobacterium tumefaciens*, souche GV3101, a été utilisée pour les transformations stables d'*Arabidopsis*. La souche GV3101 possède les gènes de résistance à la gentamycine et la rifampicine, et présente une forte capacité d'infection.

### 1.3. Bactéries pathogènes

*Pseudomonas syringae* pv. *tomato* (*Pst*) est une bactérie à Gram négatif, hémibiotrophe, et responsable de la maladie de la moucheture sur la tomate et *Arabidopsis*. Deux souches de cette bactérie, fournies par (Glazebrook and Ausubel 1994) ont été utilisées dans ce travail : la souche *Pst* DC3000 (*Pst*) qui est virulente sur *Arabidopsis*, Col-0, et la souche DC3000 transformée avec un vecteur portant le gène d'avirulence bactérien *AvrRpm1* (*Pst-AvrRpm1*), qui est avirulente sur Col-0. Ces deux souches possèdent les gènes de sélection pour la résistance à deux antibiotiques : la rifampicine et la kanamycine. Les bactéries sont conservées à -80°C dans du milieu de culture supplémenté à 80% de glycérol.

Lignée mutante	Numéro de référence	Numéro d'accèsion du gène muté	Ecotype
<i>big-1</i>	SALK_045560	AT4G02260	Col-0
<i>big-3</i>	SALK_107817	AT4G02260	Col-0
<i>cat2</i>	SALK_059978	AT4G35090	Col-0
<i>cpr5</i>	RATM11-5538-1	AT5G64930	Ws
<i>ex1</i>	SALK_026475	AT4G33630	Col-0
<i>ex2</i>	SALK_112295	AT1G27510	Col-0
<i>fry1-6</i>	SALK_020882	AT5G63980	Col-0
<i>gun1-1</i>	Don de Sandra Noir	AT2G31400	Col-0
<i>gun4-1</i>	Don de Sandra Noir	AT3G59400	Col-0
<i>gun5-1</i>	Don de Sandra Noir	AT5G13630	Col-0
<i>hvk1-2</i>	Flag346H03	AT4G29130	Ws
<i>lsd1</i>	SALK_042687	AT1G62830	Col-0
<i>mips1</i> ou <i>mips1-1</i>	SALK_023626	AT4G39800	Col-0
<i>mips1-2</i>	Flag605F08	AT4G39800	Ws
<i>mips2-2</i>	SALK_031685	AT2G22240	Col-0
<i>mips3-2</i>	SALK_120131	AT5G10170	Col-0
<i>mpk4</i>	SALK_056245	AT4G01370	Col-0
<i>oxf6</i>	Don de D. L. Falcone	AT1G30460	Col-0
<i>pcb2-3</i>	GABI_904C11	AT5G18660	Col-0
<i>vtc4</i>	SALK_077231	AT3G02870	Col-0

**Tableau 4. Liste des lignées d'insertion utilisées**

### 3. Oligonucléotides

Les séquences des oligonucléotides utilisés pour les clonages, génotypages, RT-PCRq, marqueurs CAPS et dCAPS, et pour la BSA sont fournies en Annexe 3.

### 4. Vecteurs

Pour les clonages de produits PCR et les séquençages, le vecteur utilisé est le vecteur pGEM-Teasy (Promega). Ce plasmide présente une double sélection : la résistance à l'ampicilline et l' $\alpha$ -complémentation.

Les inserts étaient ensuite clonés dans le plasmide pENTR3C (Invitrogen) présentant un gène conférant la résistance des bactéries à la kanamycine. Pour la transformation des plantes par *A. tumefaciens*, les ADNc des gènes *XPO1b*, *HXK1* et AT4G29100 étaient insérés dans le vecteur binaire pGWB14. Ce vecteur permet l'expression des inserts sous contrôle du promoteur 35S, l'étiquetage des protéines avec plusieurs hémagglutinines (HA) en C-ter, et confère une résistance à la kanamycine pour les bactéries et hygromycine pour les plantes. L'ADNc du gène PCB2 a été transféré dans le plasmide binaire pB7FWC2 permettant l'expression des inserts sous contrôle du promoteur 35S, la fusion des protéines en C-ter avec la protéine fluorescente « cyan fluorescent protein (CFP), et conférant une résistance à la spectinomycine pour les bactéries et au Basta® pour les plantes.

### 5. Imagerie

Les photos des colorations au bleu de trypan présentées dans l'article 2 (Bruggeman *et al.* 2014) ont été réalisées avec une loupe binoculaire (SVII, Zeiss) en utilisant un éclairage refroidi par fibre optique (épiscopique) ou un éclairage diascopique. L'équipement est associé à un système d'acquisition comprenant un ordinateur PC relié à une caméra CCD (Sony) et son boîtier de commande. La caméra est pilotée par le logiciel d'acquisition Axiovision 1.1 (Zeiss).

Les autres colorations au bleu de trypan, les observations des cotylédons et les images des tests de sensibilité au glucose ont été réalisées avec un microscope (AZ100-Nikon) et les images acquises avec une caméra numérique refroidie (DsRi1, Nikon) pilotée par le logiciel NIS-D du même constructeur.

		Durée de la période d'éclairement (sur 24h)	Intensité lumineuse ( $\mu\text{mol de photon.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ )	Hygrométrie
Chambre de culture (plantes en terre)	Jourt court	8 h	100 à 200	65%
	Jour long	16 h	150 à 200	65%
Serre	Jour court	8 h	Très variable	70 %
	Jour long	16 h	Très variable	70%
Chambre de culture <i>in vitro</i>	Jour long	16 h	100 à 200	65%

**Tableau 5. Conditions de culture des plantes.**

## II. Méthodes

### 1. Conditions et milieux de culture des plantes

#### 1.1. Conditions de culture

Les différentes conditions de cultures des plantes sont résumées dans le tableau 5.

#### 1.2. Stérilisation des graines

Une quantité variable de graines est placée dans un tube, puis il y est ajouté 1 ml d'une solution de stérilisation [90% (v/v) EtOH à 95% et 10 % (v/v) d'une solution de Bayrochlore® (1 pastille dans 40 ml d'eau)]. Les tubes sont agités pendant 5 min. La solution de stérilisation est retirée, puis les graines sont rincées 2 fois avec de l'EtOH 95%, et le maximum d'EtOH est retiré. Les graines sont ensuite séchées sous hotte stérile à flux horizontal.

#### 1.3. Culture des plantes *in vitro*

Une fois les graines stérilisées, celles-ci sont semées *in vitro* sur des boîtes de Pétri contenant du milieu MS ½ Murashige et Skoog pH 5,7 (Basalt Salt Mixture M0221 ; Duchefa ; 2,2g/L) solidifié avec 8 g/L d'agar (Phyto-Agar HP696 ; Kalys). En fonction des expérimentations, le milieu peut être supplémenté avec des antibiotiques ou des sucres. Les boîtes sont ensuite placées 48 h à 4°C afin de synchroniser la germination, puis placées en chambre de culture *in vitro*.

#### 1.4. Culture des plantes en pot sur terreau

Les plantules préalablement cultivées *in vitro* peuvent être repiquées en terre pour poursuivre leur croissance. Les pots contenant le terreau sont alors préalablement imbibés d'une solution contenant un fongicide, du Prévicur® (Bayer® CropScience) à 1 mL.L<sup>-1</sup>, et un larvicide, du Trigard® (Syngenta®) à 0,2 g.L<sup>-1</sup>. Une fois repiquées, les plantules sont transférées en serre ou en chambre de culture. Une mini-serre recouvre les pots pendant les 2 premiers jours suivant le repiquage afin de stresser le moins possible les plantules et d'assurer un repiquage efficace.





## 2. Phénotypage des plantes

### 2.1. Induction des lésions

L'analyse du développement des lésions a été réalisée sur des plantes du même âge et cultivées comme suit. Les graines sont semées sur MS  $\frac{1}{2}$  supplémenté avec 1% de saccharose (p/v) afin d'assurer une croissance rapide et homogène des différentes lignées (certains mutants croissent plus difficilement sans sucre). Après une semaine à 10 jours de croissance en chambre de culture *in vitro*, les plantules sont repiquées en pot sur terreau et placées 2 semaines en JC. Les plantes sont ensuite transférées en chambre de culture en condition de JL afin d'induire les lésions sur le mutant *mips1*. Les photos et les analyses des lésions par coloration au bleu de trypan ou par mesure de la fuite d'électrolytes sont réalisées 4 jours après transfert en JL, sauf indication contraire. Tous les prélèvements pour les extractions de métabolites ou d'ARN sont réalisés en milieu de photopériode, et 4 jours après transfert en JL sauf indication contraire. De plus, pour chaque échantillon, les feuilles de plusieurs plantes sont « poolées » dans un seul tube.

### 2.2. Phénotypage des cotylédons

Dans tous les cas, les graines utilisées avaient été récoltées sur des plantes mères cultivées en même temps et dans les mêmes conditions. Les graines des différentes lignées sont semées sur du milieu MS  $\frac{1}{2}$  gélosé. Comme cela a été présenté dans les résultats, 4 classes de cotylédons ont été définies en fonction de la sévérité du phénotype. Pour chaque génotype, les cotylédons d'environ 100 plantules sont observés au microscope et attribués à une de ces 4 classes. Les proportions de chaque classe sont ensuite exprimées en pourcentage.

### 2.3. Mesure de la taille des racines principales

Les graines des différents génotypes analysés sont semées une à une et en ligne sur une même boîte de Pétri carrée contenant du milieu MS  $\frac{1}{2}$  gélosé. Plusieurs boîtes sont réalisées afin de semer environ 40 graines pour chaque lignée, tout en variant la position sur la boîte des graines de chaque lignée. Les boîtes sont placées verticalement en chambre de culture, et aux temps indiqués, les boîtes sont scannées, et la longueur des racines principales est mesurée à l'aide du logiciel ImageJ ([imagej.nih.gov/ij/](http://imagej.nih.gov/ij/)).



### 3. Techniques utilisées pour le génotypage des lignées mutantes

#### 3.1. Extraction d'ADN génomique

Afin d'extraire l'ADN génomique des plantes, 2 méthodes différentes ont été utilisées. Pour le génotypage, une extraction en plaque 96 tubes est réalisée selon la méthode décrite par Edwards *et al.* (1991). Une jeune feuille de rosette est placée dans un tube avec une bille d'acier (Bille acier 3000, Centre Roulement, Clermont-Ferrand) et congelée à -80°C pendant au moins 45 min. Les plaques sont ensuite agitées pendant 30 secondes à deux reprises, à une fréquence de 30 Hz grâce à un broyeur (Retsch MM300). Puis 400 µL de tampon d'extraction Edwards (Tris 1M pH 7,5, NaCl 4 M, EDTA 0,5 M, SDS 20%) sont ajoutés et les plaques sont à nouveau agitées 30s à 30 Hz. Les échantillons sont ensuite centrifugés pendant 10 min à 4000 rpm à 4°C, et 300 µL de surnageant est prélevé et mélangé à 300 µL d'isopropanol (VWR). L'efficacité de précipitation de l'ADN est améliorée en plaçant les plaques environ 30 min à -20°C. Après une seconde centrifugation de 10 min à 400 rpm à 4°C, le surnageant est éliminé et le culot mis à sécher environ 2 heures à 37°C. L'ADN est resuspendu dans 100 µL d'eau stérile.

Pour obtenir un ADN de meilleure qualité, par exemple pour la technique de BSA, une extraction au CTAB est réalisée. L'échantillon congelé est broyé dans un tube avec deux billes d'acier au broyeur. 400µl de tampon CTAB (100mM Tris-HCl pH8, 1,4M NaCl, 2% CTAB (p/v), 20mM EDTA 4Na, 1% PVP 4000 (p/v)) sont ajoutés dans le tube qui est ensuite mis à incuber à 60°C pendant 30 minutes. 300µl de chloroforme est ajouté et le tube est vortexé puis centrifugé à 11000 rpm pendant 10 minutes. Le surnageant est transféré dans un nouveau tube auquel sont ajoutés 350µl d'isopropanol. Le tube est vortexé puis centrifugé de nouveau à 11000rpm pendant 10 minutes. Le surnageant est éliminé et le culot est lavé avec 1ml d'éthanol 70%. Une dernière centrifugation est effectuée et le maximum d'éthanol est éliminé avant que le culot ne soit mis à sécher sous vide pendant 5 minutes. Une fois sec, le culot est resuspendu avec 100µl d'eau.

#### 3.2. Génotypage

2 µl de l'extrait préparé ci-avant sont utilisés pour le génotypage par PCR à l'aide de la Taq (Promega). La réaction a lieu en présence de 500 ng de chaque nucléotide, 0,25 mM de dNTP, 500mM de KCl, 100mM de Tris-HCl pH8,8, 25mM de MgCl<sub>2</sub>, 1% de triton et de 2 U d'enzyme dans un volume final de 20 µL. Les réactions sont réalisées dans un thermocycleur (Thermocycleur 2720, Applied-Biosystem). Les séquences des amorces et les couples d'amorces indiqués dans les tableaux 6 et 7 (Annexe 3) sont utilisés pour détecter l'allèle sauvage ou mutant



de chaque gène ciblé. Les produits de PCR sont séparés par électrophorèse sur gel d'agarose 1%, TAE 0,5 X, et colorés au bromure d'éthidium (BET) (4 µg/mL).

## 4. Techniques de clonage

### 4.1. Amplification de l'insert par PCR

Les ADNc des gènes *HXK1* et *At4g29100* ont été respectivement amplifiés à partir des clones G21654 et U16338, disponibles dans des banques publiques de clones (<http://www.arabidopsis.org>). Les différentes amorces utilisées pour le clonage sont listées dans le tableau 8 (Annexe 3). Les ADNc des gènes *PCB2* et *XPO1b* ont été amplifiés par « reverse transcription » (RT) réalisées sur des ARN extraient à partir de plantes sauvages Col-0.

Les fragments d'ADN à cloner sont amplifiés par PCR avec une polymérase à activité correctrice : la Pfu (Promega). L'amplification par la Pfu est réalisée à partir de 10 ng d'ADN matrice, ou 4 µL de premier brin ADNc, en présence de 500 ng de chaque nucléotide, 0,25 mM de dNTP, 1X de tampon Pfu et de 2 U d'enzyme dans un volume final de 50 µL.

Les amplifias sont séparés sur gel d'agarose 1%, extraits du gel et purifiés à l'aide du kit NucleoSpin Gel and PCR Clean-up (Macherey-Nagel) selon les instructions du fournisseur.

### 4.2. Ligation vecteur – insert(s)

Les ligations sont réalisées à l'aide de la T4 DNA ligase (Promega) dans un volume final de 10 µL (tampon ligase 1X, 1 unité d'enzyme) avec un rapport insert/vecteur de 3/1 en nombre de molécules. La réaction s'effectue sur la nuit à 4°C.

### 4.3. Le système Gateway®

Une fois dans le vecteur pENTR3C (Invitrogen), l'insert peut être transféré par recombinaison homologue dans les vecteurs binaires. Pour cela, 150 ng de chaque vecteur sont mis en présence de 2µL du LR clonase II enzyme mix® (Life technologies) dans un volume final de 10 µL. Après incubation 1h à 25°C, 1 µL de protéinase K est ajouté à la réaction. Après 15 min à 37°C, 1 µL de mélange réactionnel peut être utilisé afin de transformer des bactéries électrocompétentes.



#### 4.4. Transformation des bactéries par électroporation

40  $\mu$ L de bactéries électro-compétentes sont mélangés à 3  $\mu$ L de ligation purifiée. Le mélange est placé dans une cuve à électroporation de 1mm et soumis à un courant de 1,8 kV (électroporateur *E. coli*-Gene Pulser, Bio-Rad). 700  $\mu$ L de SOC (LB + glucose 3% p/v) sont ajoutés immédiatement. Les bactéries sont placées 1 h à 37°C, ou 30°C pour les Agrobactéries, avant d'être étalées sur le milieu LB gélosé (Life Technologies) 32 g/L, contenant l'antibiotique approprié et incubées à 37°C toute la nuit, ou pendant 2 jours à 30°C s'il s'agit d'Agrobactéries. Pour les bactéries transformées avec le vecteur pGEM-Teasy, le milieu est supplémenté en X-Gal 40  $\mu$ g/mL / IPTG 80  $\mu$ g/mL (Invitrogen).

#### 4.5. PCR sur colonies

On réalise les PCR directement sur les colonies bactériennes afin de vérifier qu'elles contiennent le vecteur et l'insert souhaités. L'amplification par la Taq polymérase est réalisée dans les conditions décrites précédemment, pour un volume final de 20  $\mu$ L.

#### 4.6. Extraction d'ADN plasmidique

Les mini-préparations d'ADN sont réalisées à partir d'une colonie mise en culture dans plusieurs mL de LB liquide (Life Technologies) 20 g/L, avec l'antibiotique approprié, et incubée sous agitation à 37°C pendant une nuit, selon la méthode de la lyse alcaline. La culture est tout d'abord centrifugée 5 min à 12000 g. Le surnageant est jeté et le culot resuspendu dans 200  $\mu$ L de solution I (TRIS.Hcl PH8 1M 2.5mL, EDTA PH8 0.5M 2mL, Glucose 40% 2.3mL, eau 93,2 mL) en vortexant vigoureusement. Puis 400  $\mu$ L de solution II (Pastille NaOH 1,6g, SDS 20% 10mL, eau qsp 200mL) sont ajoutés et mélangés doucement en retournant les tubes, on laisse agir maximum 5 min à température ambiante. 300  $\mu$ L de solution III (Acétate de Potassium 5M 60mL Acide Acétique glacial 11,5mL, eau 28,5mL) sont alors ajoutés et les tubes sont vortexés puis centrifugés 5 min à 12000 g. Le surnageant est récupéré et l'ADN est précipité avec 0,7 volume d'isopropanol (Propanol-2). Après 10 min de centrifugation à 12000 g à 4°C, le culot est lavé avec 500 $\mu$ l d'éthanol 70% avant une dernière étape de centrifugation 5 min à 12000 g à 4°C. Une fois que le culot est bien sec (placé sous vide), il est repris dans 50  $\mu$ L d'eau stérile.





#### 4.7. Digestion des plasmides

Les plasmides sont digérés à l'aide des enzymes de restriction choisies (Promega), dans le tampon approprié à l'enzyme et la concentration adéquate selon les indications du fournisseur. Si la digestion est juste un contrôle de la présence de l'insert dans le plasmide, celle-ci est réalisée dans un volume de 20 µL, mais si la digestion a pour but la purification d'un insert ou d'un plasmide, alors elle est réalisée dans un volume de 50 µL. Dans les deux cas, la digestion est déposée sur un gel d'agarose 1%. Pour la purification de l'insert ou le plasmide, sous les UV (UV Transilluminateur, Serlabo), la bande désirée est ensuite découpée, et l'ADN en est extrait à l'aide du kit NucleoSpin Gel and PCR Clean-up (Macherey-Nagel). Un aliquot d'ADN extrait (5 µL) est déposé sur gel et la quantité d'ADN est estimée grâce au marqueur de poids moléculaire quantifié (Smart Ladder, Eurogentec).

#### 4.8. Séquençage

Les ADNs plasmidiques sont séquencés par la firme Eurofins mwg/operon par une méthode de Sanger améliorée dite « cyclique ».

### 5. Transformation d'*Arabidopsis*

#### 5.1. Préparation de la suspension d'Agrobactéries

Une préculture de 2 mL est réalisée à 30°C sous agitation (200 rpm) sur la nuit, et 300 mL de LB contenant de la rifampicine (10 mg/L) et l'antibiotique approprié sont ajoutés à cette préculture. La culture est remplacée sous agitation, et le lendemain, elle est centrifugée 15 minutes à 5500 g, le culot est repris dans 150 mL de saccharose 5% (p/v) et 0,05% (v/v) de Silwet (Witco Europe SA) jouant le rôle de détergeant.

#### 5.2. Préparation et transformation des plantes

Les plantes sont transformées avec les constructions souhaitées par *A. tumefaciens* selon la méthode « floral-dip » (Clough and Bent 1998): les inflorescences sont trempées 1 min dans la suspension d'Agrobactéries préparée précédemment. Les plantes sont ensuite couvertes d'une cloche pendant 48h et maintenues en serre jusqu'à maturité des siliques.



### 5.3. Sélection des plantes transformantes

Les graines des plantes transformées avec les constructions dans le plasmide pGWB14 sont semées sur milieu MS ½ supplémenté de 30 µg/mL d'hygromycine. Après 10 jours de croissance en chambre de culture in vitro, les plantes résistantes sont repiquées sur terreau.

Les plantes transformées avec des constructions dans le plasmide pB7FWC2 sont semées sur un bac de sable arrosé avec une solution de BASTA (Glufosinate d'Ammonium 625 µL pour 10L d'eau). Après 10 jours en jours courts, les plantes résistantes sont repiquées en terreau.

Ces étapes de sélection sont répétées à chaque génération.

## 6. Mesure de l'expression des gènes

### 6.1. Extraction et transcription inverse des ARNs

Les ARN totaux sont extraits et traités à la rDNase avec le kit Nucleospin RNA II (Macherey-Nagel) selon les instructions du fournisseur, à partir de plantules ou de feuilles de rosette entières préalablement broyées dans l'azote à l'aide d'un mortier et d'un pilon, ou grâce au broyeur à billes. 50 à 100mg de tissus sont utilisés pour ces extractions. Les ADNc sont synthétisés à partir de 2µg de ces ARNs totaux grâce à la Reverse Transcriptase ImProm-IITM (Promega) et des amorces oligo(dT) ou aléatoires (random), selon les instructions du fournisseur.

### 6.2. PCR quantitative

Les réactions de PCR quantitative (PCRq) sont réalisées en plaque 96 puits avec l'appareil LightCycler 480 Real-PCR System (Roche Applied Science). Le SYBR green est utilisé selon les indications du fournisseur afin de suivre les réactions d'amplification (100nM de chaque amorce, SYBRmastermix 1X et 1/25ième du produit de RT, dans 15µl de volume final). Les cycles utilisés sont les suivants : 1 cycle 5min/95°C, 45 cycles 15sec/95°C – 20sec/60°C – 15sec/72°C, et 1 cycle 5min/72°C. Les amorces utilisées sont indiquées en Annexe 3 (Tableau 9). La spécificité des produits d'amplification est évaluée grâce à des courbes de dissociations. Le logiciel LightCycler480 (Roche applied Science) calcule automatiquement le niveau d'expression relative des gènes d'intérêts grâce à des algorithmes basés sur la méthode des  $\Delta C_t$ . Les gènes de références PDF2 ou UBI10 sont employés comme contrôles internes afin de normaliser le signal.



### 6.3. Analyses transcriptomiques

Les ARN utilisés pour les analyses transcriptomiques proviennent de feuilles de rosette des génotypes indiqués, prélevés 4 jours après transfert en JL. Ils ont été extraits comme décrit précédemment. Les analyses transcriptomiques sont ensuite réalisées par la plateforme transcriptomique à l'Unité de Recherche en Génomique Végétale (INRA, Evry), en utilisant des puces CATMA (Complete Arabidopsis Transcriptome MicroArray) version 6 contenant 38 511 sondes. Chaque lignée mutante est comparée au sauvage Col-0. Les RT, les hybridations et les analyses bioinformatiques sont décrites dans l'article 2 (Bruggeman *et al.* 2014).

L'ensemble des données des analyses transcriptomiques réalisées au cours de ma thèse est déposé à CATdb (<http://urgv.evry.inra.fr/CATdb/>) avec les numéros d'accessions AU12-06\_CPSF30 (pour l'analyse sur le mutant *mips1 oxt6*) et AU13-15\_sup62 (pour l'analyse sur le supprimeur *mips1 somi2*).

## 7. Cartographie des mutations des supprimeurs

### 7.1. Obtention des lignées recombinantes

Les supprimeurs *mips1 somi1*, *mips1 somi2* et *mips1 somi3* dans le fond génétique Col-0 ont été croisés avec le mutant *mips1-2*, dans le fond génétique Ws. Les mutations *mips1* et *mips1-2* sont alléliques et conduisent toutes deux au développement de lésions en JL. Comme les mutations *somi1*, 2 et 3 sont récessives, les descendants F1 présentaient tous des lésions. Ces plantes sont autofécondées, et après brassage génétique les phénotypes supprimeurs réapparaissent en génération F2, ce qui correspond à des plantes homozygotes pour la mutation *somi1*, *somi2* ou *somi3*. Pour confirmation, le phénotype des descendants F3 des plantes F2 sélectionnées a été systématiquement vérifié.

### 7.2. Bulk segregant analysis

Les individus F2 présentant un phénotype supprimé sont homozygotes pour le locus *somi1*, 2 ou 3, localisés sur une partie du génome de type Col-0. Les autres parties du génome pouvant être indifféremment de type Col-0 ou Ws.

C'est sur ce principe qu'est basée la technique de « Bulk Segregant Analysis » (BSA), que nous avons utilisée afin de positionner de manière approximative les loci *somi1*, 2 et 3. Pour cela, l'ADN de 22 plantes F2 sans lésion a été extrait au CTAB et « poolé » en 2 échantillons. 2 autres



échantillons d'ADN ont été obtenus en « poolant » l'ADN de 22 plantes F2 avec lésions. Des PCR ont été réalisées sur ces 4 échantillons et sur de l'ADN issu de plantes sauvage Col-0 et Ws, en utilisant des amorces de marqueurs microsatellites répartis tout le long du génome, polymorphes entre Col-0 et Ws. Les séquences de ces marqueurs microsatellites sont présentées dans le tableau 10 (Annexe 3). Les PCR sont séparées par électrophorèse sur gel d'agarose 4%.

### 7.3. Extraction d'ADN nucléaire

L'ADN de 156, 112 et 100 plantes recombinantes F2 présentant un phénotype supprimé respectivement pour les supresseurs *mips1 somi1*, *mips1 somi2* et *mips1 somi3*, a été extrait. Pour chaque plante, 4 disques de feuilles de rosette ont été prélevés avec un emporte pièce de 1 cm de diamètre. Tous les disques provenant de toutes les plantes F2 prélevées, issues du même supresseur, ont été rassemblés et broyés dans de l'azote liquide à l'aide d'un mortier et d'un pilon. L'ADN nucléaire de ce broyat a ensuite été extrait comme suit.

Afin de limiter au maximum la présence d'ADN chloroplastique lors du séquençage du génome des supresseurs, l'ADN nucléaire a été extrait avec un protocole type CTAB modifié. Le broyat représentant une très grande quantité de matériel, celui-ci a été séparé en 4 échantillons qui ont été rassemblés à la fin de l'expérimentation. Sur chaque broyat, sont ajoutés 10mL de tampon d'extraction refroidi (100mM Tris-HCl pH 9,5, 10mM EDTA pH 8, 100mM KCl, 500mM saccharose, 4mM spermidine, 1mM spermine, 0,1% (v/v) de  $\beta$ -Mercaptoethanol). La solution est filtrée, 2mL de tampon de lyse refroidi (tampon précédent + 10% Triton X-100) sont ajoutés au filtrat, puis le tout est mélangé par retournement des tubes, et placé 2min dans la glace, pour lyser les cellules. La solution est centrifugée à 2200g pendant 15min à 4°C, puis le surnageant est éliminé. Sur le culot, 500 $\mu$ L de tampon d'extraction au CTAB (100mM Tris-HCl pH 7,5, 0,7M NaCl, 1% CTAB (p/v), 10mM EDTA et 0,1% (v/v) de  $\beta$ -Mercaptoethanol) sont rajoutés. Le culot est resuspendu par agitation douce et incubé 30min à 60°C, durant lesquelles les tubes sont agités toutes les 10min. Ensuite, 350 $\mu$ L de chloroforme/Iso-amyl alcool (24 :1) sont ajoutés, les tubes sont agités doucement pendant 2min puis centrifugés à 6000rpm pendant 10min. La phase supérieure est récupérée et mélangée avec 450 $\mu$ L d'isopropanol refroidi. Après agitation, les tubes sont centrifugés à 13000 rpm pendant 6min et le surnageant est éliminé. Le culot est lavé avec de l'EtOH à 75%, les tubes sont centrifugés à 13000rpm pendant 5min. Les culots sont séchés sous vide et resuspendus avec 55 $\mu$ L d'eau stérile. La concentration en ADN double brin est mesurée avec le fluorimètre Qubit® (Life technologies) selon les instructions du fournisseur.





#### 7.4. Séquençage de l'ADN nucléaire issu des lignées recombinantes

Une quantité supérieure à 6µg d'ADN est nécessaire pour le séquençage à haut débit qui a été réalisé par deux sociétés différentes en fonction des génotypes: MacroGen (Séoul, Corée du sud) pour le supprimeur *mips1 somi1*, et BGI Tech solutions (Tai Po, Hong Kong) pour les supprimeurs *mips1 somi2* et *mips1 somi3*. Les deux compagnies utilisent la technologie Illumina HiSeq2000® pour le séquençage.

#### 7.5. Analyse des séquences

A l'aide d'un ordinateur à forte puissance de calcul, les séquences d'environ 100 pb appelées « reads », sont analysées avec le logiciel CLC genomic workbench® ([www.clcbio.com](http://www.clcbio.com)), gracieusement mis à disposition par l'Institut des Sciences du Végétal (CNRS, Gif/Yvette). Dans un premier temps, l'ensemble des reads est aligné sur le génome sauvage d'*A. thaliana*, écotype Col-0 (TAIR10). Pour l'analyse des 3 supprimeurs, les données de séquence correspondaient à un recouvrement d'environ 50 fois du génome sauvage. Le logiciel permet ensuite la détection de substitutions, et de petites insertions et délétions (1 à 5 nucléotides), au sein des reads, en comparaison avec le génome de Col-0. Les mutations présentent dans 100% des reads, situées dans la région chromosomique préalablement identifiée par la technique de BSA, sont alors retenues comme candidates préférentielles.

#### 7.6. Marqueurs CAPS et dCAPS

Si plusieurs mutations candidates avaient été identifiées à la suite de l'analyse des séquences, l'élimination de celles non liées aux loci *somi* a été effectuée grâce à l'utilisation de marqueurs de type « Cleaved Amplified Polymorphic Sequences » (CAPS) ou dCAPS (derivedCAPS). Pour cela, les supprimeurs ont été retro-croisés 2 fois avec *mips1* pour éliminer le maximum de mutations résiduelles créées par l'EMS. Puis l'ADN d'au moins 20 supprimeurs a été extrait au CTAB et des PCR ont été effectuées sur chaque échantillon. Les séquences et les couples d'amorces utilisés sont indiqués dans les tableaux 11 et 12 (Annexe 3). Pour les marqueurs CAPS, des amorces situées en amont et en aval de la mutation sont utilisées. Celle-ci créant ou supprimant un site de restriction, la digestion avec une enzyme de restriction permet ainsi de détecter le polymorphisme. Pour les marqueurs dCAPS, une amorce est éloignée de la mutation, alors que l'autre la recouvre. Un ou deux « mismatch » dans cette amorce permet de créer ou supprimer un site de restriction au niveau de la mutation ciblée. 10 µL de PCR sont alors



digérés avec les enzymes de restriction (Promega) appropriées (Tableau 12, Annexe 3). Les produits de digestion sont séparés par électrophorèse sur gel d'agarose 4%.

## **8. Méthodes relatives à la détection de la mort cellulaire**

### **8.1. Coloration au bleu de trypan**

Les feuilles de rosette sont placées dans un tube et recouvertes de la solution de bleu de trypan (25% Acide lactique à 70%, 23% Phénol saturé en eau, 25% Glycérol, 2,5mg/mL Bleu de trypan, eau stérile qsp 100%). Les tubes sont placés dans une cloche à vide, et 3 cycles d'infiltration de 5min sont réalisés. Les échantillons sont rincés avec de l'eau distillée pour éliminer complètement la solution de bleu de trypan. Puis les échantillons sont immergés dans de l'eau distillée et les tubes sont placés 2min dans de l'eau bouillante. Une fois l'échantillon refroidi, les feuilles sont décolorées plusieurs jours au chloral hydrate (8 g de chloral hydrate, 1 mL d'eau et 2 mL de glycérol 50%.) avant observations à la loupe binoculaire ou au microscope.

### **8.2. Mesure de la fuite d'électrolytes**

Pour les mesures de fuites d'électrolytes, des disques de feuilles des génotypes indiqués ont été prélevés avec un emporte-pièce de 5 mm et mis à flotter sur de l'eau distillée pendant 10 minutes. Les disques sont ensuite transférés dans un tube contenant 2 ml d'eau distillée et placés sous agitation pendant 2 heures. Chaque tube contient six disques foliaires du même génotype et provenant de plusieurs plantes. La conductivité ( $\mu\text{S} / \text{cm}$ ) de l'eau d'incubation a ensuite été mesurée avec le conductimètre MDP 210 (Radiometer analytique).

### **8.3. Coloration au DAB**

Afin de détecter la présence d' $\text{H}_2\text{O}_2$  dans les feuilles de rosette, une coloration au 3,3'-DiAminoBenzidine (DAB) a été effectuée. Aux temps indiqués, les feuilles de rosette sont photographiées puis placées dans une solution de DAB (1mg/mL dans de l'eau stérile). La solution recouvre totalement les feuilles. Puis les échantillons sont placés sous vide pendant 5 min. L'opération est répétée 2 à 3 fois jusqu'à ce que les feuilles soient bien infiltrées. Puis les échantillons sont laissés toute la nuit dans la solution de DAB, à température ambiante et à l'obscurité. Les feuilles sont décolorées avec de l'éthanol de plus en plus concentré, puis placées entre lame et lamelle dans une solution de chloral hydrate, et sont observées au microscope.



## 9. Dosage de métabolites

### 9.1. Dosage du glutathion

Les dosages du glutathion sont réalisés par spectrophotométrie *via* un couplage enzymatique. L'utilisation d'un lecteur de microplaque (type Multiskan spectrophotometer, Thermo Fisher Scientific) permet de réaliser les dosages dans plusieurs échantillons à la fois tout en effectuant des tripliquats techniques, avec un seuil de détection en dessous de la picomole. Tous les réactifs ont été fournis par la société Sigma-Aldrich®. La méthode est décrite par Queval and Noctor (2007). Environ 100 mg de feuilles sont broyées au mortier dans l'azote liquide, auxquels 1 mL de HCl 0,2 N est ajouté. Après décongélation du broyat, celui-ci est transféré dans un tube de 2 mL. L'extrait est ensuite centrifugé pendant 10 min à 14000g, à 4°C, et le surnageant récupéré. 500 µL de surnageant sont neutralisés en ajoutant 50 µL de NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 200 mM pH 5,6 et un volume suffisant de NaOH 0,2 M (environ 400 µL) pour atteindre un pH 5 - 6. Le volume exact rajouté est noté. Les formes réduite (GSH) et oxydée (GSSG) du glutathion sont dosées par une réaction de recyclage en suivant la réduction du DTNB (5,5'-dithiobis-2-nitrobenzoate ou réactif d'Ellman, Sigma-Aldrich®) à 412 nm par le glutathion en présence de glutathion réductase (GR, Roche Applied Science) et de NADPH. 10 µL d'extrait sont mélangés à du NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 100 mM (pH 7,5), EDTA 5 mM, DTNB 0,6mM, NADPH 0,5mM dans un volume final de 200 µL. La réaction est initiée par l'ajout de 0,2 U de GR et suivie à 412 nm et 25°C pendant 5 min. La concentration en glutathion est calculée à partir de standards de GSH. Le même dosage par couplage enzymatique permet de doser le GSSG sur 20 µL d'extrait. Sont d'abord incubés 200 µL d'extrait en présence de 2 µL de 2-vinylpyridine pendant 30 min à température ambiante, puis 2 centrifugations successives sont effectuées pendant 15 min, chacune à 14000g à 4°C, pour enlever la 2-vinylpyridine. Les standards de GSSG sont traités de la même manière que les extraits. Les valeurs présentées sont les moyennes des résultats obtenus pour 4 réplicas biologiques.

### 9.2. Dosage du SA total, SA libre, scopolétine et camalexine

Environ 100 mg de feuilles de rosette provenant de plusieurs plantes sont prélevés en JC et 4 jours après transfert en JL. Les dosages du SA total, du SA libre, de la scopolétine et de la camalexine ont été réalisés selon la méthode décrite dans l'article 2 (Bruggeman *et al.* 2014). Les valeurs présentées sont les moyennes des résultats obtenus pour 4 réplicas biologiques.



### 9.3. Métabolome : dosage du MI, galactinol, raffinose et autres

Environ 100 mg de feuilles de rosette provenant de plusieurs plantes sont prélevés 4 jours après transfert en JL. Les échantillons sont lyophilisés pendant 48h, puis broyés au broyeur à bille. Les métabolites sont extraits par addition de 500  $\mu$ L de méthanol refroidi contenant 250 $\mu$ M de ribitol comme standard interne. Les extraits sont ensuite chauffés à 70°C pendant 15 minutes et vortexés régulièrement. 500  $\mu$ L de chloroforme sont ensuite ajoutés et les échantillons sont vortexés et incubés à 37 ° C pendant 5 min. Puis, 450 $\mu$ L d'eau ultra-pure, contenant 250 $\mu$ M de ribitol, sont ajoutés aux extraits qui sont centrifugés pendant 5 min à 13 200 g, à 4 ° C pour séparer les phases. La phase supérieure (600  $\mu$ L) est prélevée et 50  $\mu$ L de ce surnageant sont évaporés pendant une nuit sous vide. Les métabolites de ces échantillons ont ensuite été analysés par la plateforme métabolomique de l'Institut de Biologie Moléculaire des Plantes (CNRS, Strasbourg) par chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (GC-MS). Le traitement des échantillons et les analyses GC-MS sont décrits dans l'article 3. Les valeurs présentées sont les moyennes des résultats obtenus pour 4 répliques biologiques.

### 9.4. Dosage des phytohormones

Environ 120 mg de feuilles de rosette provenant de plusieurs plantes sont prélevés en JC et 4 jours après transfert en JL. Les échantillons sont broyés au mortier et pilon dans de l'azote liquide, puis lyophilisés 48 heures. Les échantillons lyophilisés sont pesés puis traités par la Plateforme de Chimie du Végétal (Institut Jean-Pierre Bourgin, INRA, Versailles) qui a effectué les dosages de l'auxine, de l'ABA, du JA et des cytokinines par chromatographie liquide couplée à de la spectrométrie de masse. Les valeurs présentées sont les moyennes des résultats obtenus pour 4 répliques biologiques.

## 10. Dosage des activités hémokinasé

Environ 200 mg de feuilles de rosette provenant de plusieurs plantes sont prélevés 2 jours après transfert en JL. Les échantillons sont broyés au mortier et pilon dans de l'azote liquide, puis 2 ml de tampon d'extraction [50 mM Bicine - tampon NaOH (pH 8,5), 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,1% (v/v) de Triton X-100, quelques microlitres cocktail d'un inhibiteur de protéase (Sigma-Aldrich)]. Les extraits sont centrifugés pendant 5 min à 10 000 rpm à 4 ° C et le surnageant est dessalé à l'aide de colonnes PD10 (GE Healthcare). Pour cela, le surnageant est déposé sur les colonnes, puis 500  $\mu$ L de tampon d'élution (similaire à un tampon d'extraction mais sans triton) sont ajoutés. Puis les





extraits sont élués de la colonne avec 3,5ml de tampon d'élution. Les extraits dessalés sont directement utilisés pour les mesures d'activité ou les dosages de protéines. Pour la mesure de l'activité de la glucokinase (phosphorylation du glucose), 200  $\mu$ L d'extrait dessalé sont ajoutés à 700  $\mu$ L de tampon de réaction de glucose [50 mM de Bicine - NaOH (pH 8,5), 5 mM de  $MgCl_2$ , 1 mM de NADP, ATP 2,5 mM, et 1 unité/ml d'enzyme G6PDH (Roche)] dans une cuvette de 1 mL. La réaction est démarrée par ajout de 100  $\mu$ L de glucose à 20 mM, mélangée, et l'absorbance à 340 nm (NADPH) est mesurée en continu pendant 30 min avec un spectrophotomètre. Pour l'activité fructokinase (phosphorylation du fructose), 200  $\mu$ L d'extrait dessalé sont mélangés avec 700  $\mu$ L tampon de réaction de fructose [50 mM de Bicine - NaOH tampon (pH 8,5), 5 mM de  $MgCl_2$ , 1 mM de NADP, 2,5 mM de l'ATP, 1 unité/ml de G6PDH, et 2 unités/ml d'enzyme Phosphoglucosomérise (Roche)]. La réaction est démarrée par ajout de 100  $\mu$ L de fructose à 20 mM, puis les mesures sont effectuées comme pour l'activité glucokinase. Les données présentées ici sont la moyenne des résultats obtenus à partir de 4 répliques biologiques.

## 11. Tests de sensibilité à *P. syringae*

La culture des bactéries est réalisée en conditions stériles par étalement d'un stock glycérolé sur milieu solide LB agar sélectif contenant 50  $\mu$ g.mL<sup>-1</sup> de rifampicine et 25  $\mu$ g.mL<sup>-1</sup> de kanamycine. Cette culture est laissée deux jours dans une étuve à 30°C. Elle est ensuite repiquée dans 50 mL de milieu LB liquide supplémenté de 50  $\mu$ g.mL<sup>-1</sup> de rifampicine et de 25  $\mu$ g.mL<sup>-1</sup> de kanamycine et incubée pendant une nuit à 30°C sous agitation (150 rpm). Le lendemain, les bactéries centrifugées 10 min à 3000g. Le culot bactérien obtenu est lavé dans environ 50 mL de  $MgCl_2$  10 mM. Les bactéries centrifugées une deuxième fois. Le culot est alors resuspendu dans un faible volume de  $MgCl_2$ . La concentration en bactéries dans la suspension est évaluée par mesure de la densité optique à 600 nm, puis ajustée par ajout de  $MgCl_2$  10 mM, sachant que 0,01 unité DO à 600 nm correspond à 10<sup>7</sup> unités formant des colonies (cfu) par mL de suspension.

Un jour avant inoculation, les plantes âgées de 6 semaines, cultivées en chambre de culture JC, sont placées sous humidité saturante à l'aide d'une mini serre de sorte que les stomates soient bien ouverts le jour des inoculations. L'inoculation est réalisée par infiltration de la face abaxiale à l'aide d'une seringue de 1 mL, sans aiguille.

Les plantes sont inoculées avec une suspension de *Pst* ou *Pst-AvrRpm1* à 10<sup>7</sup> cfu/mL pour l'analyse des teneurs en SA. En parallèle des plantes sont infiltrées avec du  $MgCl_2$  10 mM. 100



mg de feuilles infiltrées sont prélevés aux temps indiqués, puis le SA est dosé dans 4 échantillons par génotype, comme décrit précédemment.

Pour les tests de résistance, l'infiltration des plantes est effectuée avec des suspensions de *Pst* et de *Pst-AvrRpm1* diluées à  $10^5$  cfu/mL. Cinq plantes par génotype sont inoculées sur 3 à 5 feuilles. Les plantes sont ensuite replacées sous humidité saturante dans des mini serres en chambre de culture jours courts pour 24 h. Aux temps indiqués, cinq échantillons sont générés pour chaque génotype. Pour chaque échantillon, 4 disques foliaires de 0,5 cm de diamètre sont prélevés sur 2 plantes (2 disques par plante). Les disques sont placés dans des tubes contenant 2 billes en métal et 400  $\mu$ L d'eau stérile, puis broyés à l'aide d'un broyeur à billes (1 min à 25 Hz). Des dilutions sériées du broyat sont réalisées de dix en dix, puis 10  $\mu$ L de chaque dilution sont déposés sur du milieu LB agar, additionné de rifampicine et de kanamycine (à 50 et 25  $\mu$ g/mL respectivement). Après incubation 48 h à 30°C, les colonies ont été dénombrées.



# REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES



- Adhikari, J., Majumder, A.L., Bhaduri, T.J., Dasgupta, S. and Majumder, A.L.** (1987) Chloroplast as a Locale of L-myo-Inositol-1-Phosphate Synthase. *Plant physiology*, **85**, 611-614.
- Adhikari, N.D., Froehlich, J.E., Strand, D.D., Buck, S.M., Kramer, D.M. and Larkin, R.M.** (2011) GUN4-porphyrin complexes bind the ChlH/GUN5 subunit of Mg-Chelatase and promote chlorophyll biosynthesis in Arabidopsis. *The Plant cell*, **23**, 1449-1467.
- Ahuja, I., Kissen, R. and Bones, A.M.** (2012) Phytoalexins in defense against pathogens. *Trends in plant science*, **17**, 73-90.
- Alonso, J.M., Stepanova, A.N., Leisse, T.J., Kim, C.J., Chen, H., Shinn, P., Stevenson, D.K., Zimmerman, J., Barajas, P., Cheuk, R., Gadrinab, C., Heller, C., Jeske, A., Koesema, E., Meyers, C.C., Parker, H., Prednis, L., Ansari, Y., Choy, N., Deen, H., Geralt, M., Hazari, N., Hom, E., Karnes, M., Mulholland, C., Ndubaku, R., Schmidt, I., Guzman, P., Aguilar-Henonin, L., Schmid, M., Weigel, D., Carter, D.E., Marchand, T., Risseuw, E., Brogden, D., Zeko, A., Crosby, W.L., Berry, C.C. and Ecker, J.R.** (2003) Genome-wide insertional mutagenesis of Arabidopsis thaliana. *Science*, **301**, 653-657.
- Ameisen, J.C., Idziorek, T., Billaut-Mulot, O., Loyens, M., Tissier, J.P., Potentier, A. and Ouaiissi, A.** (1995) Apoptosis in a unicellular eukaryote (Trypanosoma cruzi): implications for the evolutionary origin and role of programmed cell death in the control of cell proliferation, differentiation and survival. *Cell death and differentiation*, **2**, 285-300.
- Andronis, E.A. and Roubelakis-Angelakis, K.A.** (2010) Short-term salinity stress in tobacco plants leads to the onset of animal-like PCD hallmarks in planta in contrast to long-term stress. *Planta*, **231**, 437-448.
- Antoniw, J.F., Dunkley, A.M., White, R.F. and Wood, J.** (1980) Soluble leaf proteins of virus-infected tobacco (Nicotiana tabacum) cultivars [proceedings]. *Biochemical Society transactions*, **8**, 70-71.
- Aoyagi, S., Sugiyama, M. and Fukuda, H.** (1998) BEN1 and ZEN1 cDNAs encoding S1-type DNases that are associated with programmed cell death in plants. *FEBS Lett*, **429**, 134-138.
- Arnaud, C., Bonnot, C., Desnos, T. and Nussaume, L.** (2010) The root cap at the forefront. *Comptes rendus biologies*, **333**, 335-343.
- Avila-Ospina, L., Moison, M., Yoshimoto, K. and Masclaux-Daubresse, C.** (2014) Autophagy, plant senescence, and nutrient recycling. *Journal of experimental botany*, **65**, 3799-3811.
- Bednarek, P.** (2012) Sulfur-containing secondary metabolites from Arabidopsis thaliana and other Brassicaceae with function in plant immunity. *Chembiochem : a European journal of chemical biology*, **13**, 1846-1859.
- Berkey, R., Bendigeri, D. and Xiao, S.** (2012) Sphingolipids and plant defense/disease: the "death" connection and beyond. *Frontiers in plant science*, **3**, 68.
- Biffen, M. and Hanke, D.E.** (1990) Reduction in the level of intracellular myo-inositol in cultured soybean (Glycine max) cells inhibits cell division. *The Biochemical journal*, **265**, 809-814.
- Bollhoner, B., Zhang, B., Stael, S., Denance, N., Overmyer, K., Goffner, D., Van Breusegem, F. and Tuominen, H.** (2013) Post mortem function of AtMC9 in xylem vessel elements. *New Phytologist*, **200**, 498-510.
- Bosch, M., Poulter, N.S., Vatovec, S. and Franklin-Tong, V.E.** (2008) Initiation of programmed cell death in self-incompatibility: role for cytoskeleton modifications and several caspase-like activities. *Molecular plant*, **1**, 879-887.
- Boss, W.F. and Im, Y.J.** (2012) Phosphoinositide signaling. *Annual review of plant biology*, **63**, 409-429.



- Bouchez, O., Huard, C., Lorrain, S., Roby, D. and Balague, C.** (2007) Ethylene is one of the key elements for cell death and defense response control in the Arabidopsis lesion mimic mutant *vad1*. *Plant physiology*, **145**, 465-477.
- Brenner, S.** (1974) The genetics of *Caenorhabditis elegans*. *Genetics*, **77**, 71-94.
- Bruggeman, Q., Garmier, M., De Bont, L., Soubigou-Taconnat, L., Mazubert, C., Benhamed, M., Raynaud, C., Bergounioux, C. and Delarue, M.** (2014) The polyadenylation factor subunit CPSF30: a key factor of programmed cell death and a regulator of immunity in Arabidopsis. *Plant physiology*.
- Buccafusca, R., Venditti, C.P., Kenyon, L.C., Johanson, R.A., Van Bockstaele, E., Ren, J., Pagliardini, S., Minarcik, J., Golden, J.A., Coady, M.J., Greer, J.J. and Berry, G.T.** (2008) Characterization of the null murine sodium/myo-inositol cotransporter 1 (Smit1 or Slc5a3) phenotype: myo-inositol rescue is independent of expression of its cognate mitochondrial ribosomal protein subunit 6 (Mrps6) gene and of phosphatidylinositol levels in neonatal brain. *Molecular genetics and metabolism*, **95**, 81-95.
- Bultynck, G., Kiviluoto, S., Henke, N., Ivanova, H., Schneider, L., Rybalchenko, V., Luyten, T., Nuyts, K., De Borggraeve, W., Bezprozvanny, I., Parys, J.B., De Smedt, H., Missiaen, L. and Methner, A.** (2012) The C terminus of Bax inhibitor-1 forms a Ca<sup>2+</sup>-permeable channel pore. *The Journal of biological chemistry*, **287**, 2544-2557.
- Caporali, E., Spada, A., Marziani, G., Failla, O. and Scienza, A.** (2003) The arrest of development of abortive reproductive organs in the unisexual flower of *Vitis vinifera* ssp *silvestris*. *Sex Plant Reprod*, **15**, 291-300.
- Chang, Y.F., Imam, J.S. and Wilkinson, M.F.** (2007) The nonsense-mediated decay RNA surveillance pathway. *Annual review of biochemistry*, **76**, 51-74.
- Chen, H. and Xiong, L.** (2010) myo-Inositol-1-phosphate synthase is required for polar auxin transport and organ development. *The Journal of biological chemistry*, **285**, 24238-24247.
- Chen, H., Xue, L., Chintamanani, S., Germain, H., Lin, H., Cui, H., Cai, R., Zuo, J., Tang, X., Li, X., Guo, H. and Zhou, J.M.** (2009) ETHYLENE INSENSITIVE3 and ETHYLENE INSENSITIVE3-LIKE1 repress SALICYLIC ACID INDUCTION DEFICIENT2 expression to negatively regulate plant innate immunity in Arabidopsis. *The Plant cell*, **21**, 2527-2540.
- Chi, W., Sun, X. and Zhang, L.** (2013) Intracellular signaling from plastid to nucleus. *Annual review of plant biology*, **64**, 559-582.
- Chico, J.M., Chini, A., Fonseca, S. and Solano, R.** (2008) JAZ repressors set the rhythm in jasmonate signaling. *Current opinion in plant biology*, **11**, 486-494.
- Clough, S.J. and Bent, A.F.** (1998) Floral dip: a simplified method for *Agrobacterium*-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana*. *The Plant journal : for cell and molecular biology*, **16**, 735-743.
- Coll, N.S., Vercammen, D., Smidler, A., Clover, C., Van Breusegem, F., Dangl, J.L. and Epple, P.** (2010) Arabidopsis type I metacaspases control cell death. *Science*, **330**, 1393-1397.
- Colmer, T.D.** (2003) Aerenchyma and an inducible barrier to radial oxygen loss facilitate root aeration in upland, paddy and deep-water rice (*Oryza sativa* L.). *Annals of botany*, **91 Spec No**, 301-309.
- Coquoz, J.L., Buchala, A. and Metraux, J.P.** (1998) The biosynthesis of salicylic acid in potato plants. *Plant physiology*, **117**, 1095-1101.
- Costet, L., Fritig, B. and Kauffmann, S.** (2002) Scopoletin expression in elicitor-treated and tobacco mosaic virus-infected tobacco plants. *Physiologia plantarum*, **115**, 228-235.
- Crowe, M.L., Serizet, C., Thareau, V., Aubourg, S., Rouze, P., Hilson, P., Beynon, J., Weisbeek, P., van Hummelen, P., Reymond, P., Paz-Ares, J., Nietfeld, W. and Trick,**

- M. (2003) CATMA: a complete Arabidopsis GST database. *Nucleic acids research*, **31**, 156-158.
- Cullen, P.J., Cozier, G.E., Banting, G. and Mellor, H. (2001) Modular phosphoinositide-binding domains--their role in signalling and membrane trafficking. *Current biology : CB*, **11**, R882-893.
- Das, R., Bagga, S. and Sopory, S.K. (1987) Involvement of Phosphoinositides, Calmodulin and Glyoxalase-I in Cell-Proliferation in Callus-Cultures of Amaranthus-Paniculatus. *Plant Sci*, **53**, 45-51.
- De Pinto, M.C., Locato, V. and De Gara, L. (2012) Redox regulation in plant programmed cell death. *Plant, cell & environment*, **35**, 234-244.
- del Pozo, O. and Lam, E. (1998) Caspases and programmed cell death in the hypersensitive response of plants to pathogens. *Current biology : CB*, **8**, 1129-1132.
- den Ende, W.V. (2013) Multifunctional fructans and raffinose family oligosaccharides. *Frontiers in plant science*, **4**, 247.
- Desgagne-Penix, I., Eakanunkul, S., Coles, J.P., Phillips, A.L., Hedden, P. and Sponsel, V.M. (2005) The auxin transport inhibitor response 3 (tir3) allele of BIG and auxin transport inhibitors affect the gibberellin status of Arabidopsis. *The Plant journal : for cell and molecular biology*, **41**, 231-242.
- Devadas, S.K., Enyedi, A. and Raina, R. (2002) The Arabidopsis hrl1 mutation reveals novel overlapping roles for salicylic acid, jasmonic acid and ethylene signalling in cell death and defence against pathogens. *Plant Journal*, **30**, 467-480.
- Dickman, M.B. and Fluhr, R. (2013) Centrality of host cell death in plant-microbe interactions. *Annual review of phytopathology*, **51**, 543-570.
- Dieck, C.B., Boss, W.F. and Perera, I.Y. (2012) A role for phosphoinositides in regulating plant nuclear functions. *Frontiers in plant science*, **3**, 50.
- Dominguez, F. and Cejudo, F.J. (2014) Programmed cell death (PCD): an essential process of cereal seed development and germination. *Frontiers in plant science*, **5**, 366.
- Donahue, J.L., Alford, S.R., Torabinejad, J., Kerwin, R.E., Nourbakhsh, A., Ray, W.K., Hernick, M., Huang, X., Lyons, B.M., Hein, P.P. and Gillasp, G.E. (2010) The Arabidopsis thaliana Myo-inositol 1-phosphate synthase1 gene is required for Myo-inositol synthesis and suppression of cell death. *The Plant cell*, **22**, 888-903.
- Donahue, T.F. and Henry, S.A. (1981) myo-Inositol-1-phosphate synthase. Characteristics of the enzyme and identification of its structural gene in yeast. *The Journal of biological chemistry*, **256**, 7077-7085.
- Doria, E., Gallechi, L., Calucci, L., Pinzino, C., Pilu, R., Cassani, E. and Nielsen, E. (2009) Phytic acid prevents oxidative stress in seeds: evidence from a maize (Zea mays L.) low phytic acid mutant. *Journal of experimental botany*, **60**, 967-978.
- Drobak, B.K. (1993) Plant Phosphoinositides and Intracellular Signaling. *Plant physiology*, **102**, 705-709.
- Du, Z., Zhou, X., Ling, Y., Zhang, Z. and Su, Z. (2010) agriGO: a GO analysis toolkit for the agricultural community. *Nucleic acids research*, **38**, W64-70.
- Edwards, K., Johnstone, C. and Thompson, C. (1991) A simple and rapid method for the preparation of plant genomic DNA for PCR analysis. *Nucleic acids research*, **19**, 1349.
- Ellis, H.M. and Horvitz, H.R. (1986) Genetic-Control of Programmed Cell-Death in the Nematode C-Elegans. *Cell*, **44**, 817-829.
- Enari, M., Sakahira, H., Yokoyama, H., Okawa, K., Iwamatsu, A. and Nagata, S. (1998) A caspase-activated DNase that degrades DNA during apoptosis, and its inhibitor ICAD (vol 391, pg 43, 1998). *Nature*, **393**, 396-396.
- Endres, S. and Tenhaken, R. (2009) Myoinositol oxygenase controls the level of myoinositol in Arabidopsis, but does not increase ascorbic acid. *Plant physiology*, **149**, 1042-1049.

- Engelberg-Kulka, H., Amitai, S., Kolodkin-Gal, I. and Hazan, R. (2006) Bacterial programmed cell death and multicellular behavior in bacteria. *PLoS genetics*, **2**, e135.
- Escamez, S. and Tuominen, H. (2014) Programmes of cell death and autolysis in tracheary elements: when a suicidal cell arranges its own corpse removal. *Journal of experimental botany*, **65**, 1313-1321.
- Estavillo, G.M., Crisp, P.A., Pornsiriwong, W., Wirtz, M., Collinge, D., Carrie, C., Giraud, E., Whelan, J., David, P., Javot, H., Brearley, C., Hell, R., Marin, E. and Pogson, B.J. (2011) Evidence for a SAL1-PAP chloroplast retrograde pathway that functions in drought and high light signaling in Arabidopsis. *The Plant cell*, **23**, 3992-4012.
- Fendrych, M., Van Hautegeem, T., Van Durme, M., Olvera-Carrillo, Y., Huysmans, M., Karimi, M., Lippens, S., Guerin, C.J., Krebs, M., Schumacher, K. and Nowack, M.K. (2014) Programmed cell death controlled by ANAC033/SOMBRERO determines root cap organ size in Arabidopsis. *Current biology : CB*, **24**, 931-940.
- Feng, B.M., Lu, D.H., Ma, X., Peng, Y.B., Sun, Y.J., Ning, G. and Ma, H. (2012) Regulation of the Arabidopsis anther transcriptome by DYT1 for pollen development. *Plant Journal*, **72**, 612-624.
- Feys, B.J., Moisan, L.J., Newman, M.A. and Parker, J.E. (2001) Direct interaction between the Arabidopsis disease resistance signaling proteins, EDS1 and PAD4. *The EMBO journal*, **20**, 5400-5411.
- Feys, B.J., Wiermer, M., Bhat, R.A., Moisan, L.J., Medina-Escobar, N., Neu, C., Cabral, A. and Parker, J.E. (2005) Arabidopsis SENESCENCE-ASSOCIATED GENE101 stabilizes and signals within an ENHANCED DISEASE SUSCEPTIBILITY1 complex in plant innate immunity. *The Plant cell*, **17**, 2601-2613.
- Fietta, P. (2006) Many ways to die: passive and active cell death styles. *Rivista di biologia*, **99**, 69-83.
- Fischer, U., Men, S. and Grebe, M. (2004) Lipid function in plant cell polarity. *Current opinion in plant biology*, **7**, 670-676.
- Fisher, S.K., Novak, J.E. and Agranoff, B.W. (2002) Inositol and higher inositol phosphates in neural tissues: homeostasis, metabolism and functional significance. *Journal of neurochemistry*, **82**, 736-754.
- Friedrich, L., Vernooij, B., Gaffney, T., Morse, A. and Ryals, J. (1995) Characterization of tobacco plants expressing a bacterial salicylate hydroxylase gene. *Plant molecular biology*, **29**, 959-968.
- Fu, J., Peterson, K., Guttieri, M., Souza, E. and Raboy, V. (2008) Barley (*Hordeum vulgare* L.) inositol monophosphatase: gene structure and enzyme characteristics. *Plant molecular biology*, **67**, 629-642.
- Fu, Z.Q., Yan, S., Saleh, A., Wang, W., Ruble, J., Oka, N., Mohan, R., Spoel, S.H., Tada, Y., Zheng, N. and Dong, X. (2012) NPR3 and NPR4 are receptors for the immune signal salicylic acid in plants. *Nature*, **486**, 228-232.
- Fulda, S. (2014) Therapeutic exploitation of necroptosis for cancer therapy. *Seminars in cell & developmental biology*.
- Gadjev, I., Stone, J.M. and Gechev, T.S. (2008) Programmed cell death in plants: new insights into redox regulation and the role of hydrogen peroxide. *International review of cell and molecular biology*, **270**, 87-144.
- Gagne, J.M. and Clark, S.E. (2010) The Arabidopsis stem cell factor POLTERGEIST is membrane localized and phospholipid stimulated. *The Plant cell*, **22**, 729-743.
- Geldner, N., Anders, N., Wolters, H., Keicher, J., Kornberger, W., Muller, P., Delbarre, A., Ueda, T., Nakano, A. and Jurgens, G. (2003) The Arabidopsis GNOM ARF-GEF mediates endosomal recycling, auxin transport, and auxin-dependent plant growth. *Cell*, **112**, 219-230.

- Gil, P., Dewey, E., Friml, J., Zhao, Y., Snowden, K.C., Putterill, J., Palme, K., Estelle, M. and Chory, J.** (2001) BIG: a calossin-like protein required for polar auxin transport in Arabidopsis. *Genes & development*, **15**, 1985-1997.
- Gillaspy, G.E.** (2011) The cellular language of myo-inositol signaling. *The New phytologist*, **192**, 823-839.
- Glazebrook, J.** (2005) Contrasting mechanisms of defense against biotrophic and necrotrophic pathogens. *Annual review of phytopathology*, **43**, 205-227.
- Glazebrook, J. and Ausubel, F.M.** (1994) Isolation of phytoalexin-deficient mutants of Arabidopsis thaliana and characterization of their interactions with bacterial pathogens. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **91**, 8955-8959.
- Granot, D., Kelly, G., Stein, O. and David-Schwartz, R.** (2014) Substantial roles of hexokinase and fructokinase in the effects of sugars on plant physiology and development. *Journal of experimental botany*, **65**, 809-819.
- Guiboileau, A., Sormani, R., Meyer, C. and Masclaux-Daubresse, C.** (2010) Senescence and death of plant organs: nutrient recycling and developmental regulation. *Comptes rendus biologies*, **333**, 382-391.
- Gunawardena, A.H.L.A.N., Greenwood, J.S. and Dengler, N.G.** (2004) Programmed cell death remodels lace plant leaf shape during development. *The Plant cell*, **16**, 60-73.
- Gunawardena, A.H.L.A.N., Sault, K., Donnelly, P., Greenwood, J.S. and Dengler, N.G.** (2005) Programmed cell death and leaf morphogenesis in Monstera obliqua (Araceae). *Planta*, **221**, 607-618.
- Guo, X., Lu, W., Ma, Y., Qin, Q. and Hou, S.** (2013) The BIG gene is required for auxin-mediated organ growth in Arabidopsis. *Planta*, **237**, 1135-1147.
- Hara-Nishimura, I. and Hatsugai, N.** (2011) The role of vacuole in plant cell death. *Cell death and differentiation*, **18**, 1298-1304.
- Hara-Nishimura, I., Takeuchi, Y. and Nishimura, M.** (1993) Molecular characterization of a vacuolar processing enzyme related to a putative cysteine proteinase of Schistosoma mansoni. *The Plant cell*, **5**, 1651-1659.
- Hassan, M., Watari, H., AbuAlmaaty, A., Ohba, Y. and Sakuragi, N.** (2014) Apoptosis and molecular targeting therapy in cancer. *BioMed research international*, **2014**, 150845.
- Hatsugai, N., Iwasaki, S., Tamura, K., Kondo, M., Fuji, K., Ogasawara, K., Nishimura, M. and Hara-Nishimura, I.** (2009) A novel membrane fusion-mediated plant immunity against bacterial pathogens. *Genes & development*, **23**, 2496-2506.
- Hatsugai, N., Kuroyanagi, M., Nishimura, M. and Hara-Nishimura, I.** (2006) A cellular suicide strategy of plants: vacuole-mediated cell death. *Apoptosis : an international journal on programmed cell death*, **11**, 905-911.
- Hatsugai, N., Kuroyanagi, M., Yamada, K., Meshi, T., Tsuda, S., Kondo, M., Nishimura, M. and Hara-Nishimura, I.** (2004) A plant vacuolar protease, VPE, mediates virus-induced hypersensitive cell death. *Science*, **305**, 855-858.
- He, R., Drury, G.E., Rotari, V.I., Gordon, A., Willer, M., Farzaneh, T., Woltering, E.J. and Gallois, P.** (2008) Metacaspase-8 modulates programmed cell death induced by ultraviolet light and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in Arabidopsis. *The Journal of biological chemistry*, **283**, 774-783.
- Hedgecock, E.M., Sulston, J.E. and Thomson, J.N.** (1983) Mutations affecting programmed cell deaths in the nematode Caenorhabditis elegans. *Science*, **220**, 1277-1279.
- Heilmann, I.** (2009) Using genetic tools to understand plant phosphoinositide signalling. *Trends in plant science*, **14**, 171-179.
- Henke, N., Lisak, D.A., Schneider, L., Habicht, J., Pergande, M. and Methner, A.** (2011) The ancient cell death suppressor BAX inhibitor-1. *Cell calcium*, **50**, 251-260.

- Hernandez-Martinez, R. and Covarrubias, L.** (2011) Interdigital cell death function and regulation: new insights on an old programmed cell death model. *Development, growth & differentiation*, **53**, 245-258.
- Heydlauff, J. and Gross-Hardt, R.** (2014) Love is a battlefield: programmed cell death during fertilization. *Journal of experimental botany*, **65**, 1323-1330.
- Hiraga, A., Kaneta, T., Sato, Y. and Sato, S.** (2010) Programmed cell death of tobacco BY-2 cells induced by still culture conditions is affected by the age of the culture under agitation. *Cell biology international*, **34**, 189-196.
- Hirose, N., Takei, K., Kuroha, T., Kamada-Nobusada, T., Hayashi, H. and Sakakibara, H.** (2008) Regulation of cytokinin biosynthesis, compartmentalization and translocation. *Journal of experimental botany*, **59**, 75-83.
- Hitomi, J., Christofferson, D.E., Ng, A., Yao, J., Degterev, A., Xavier, R.J. and Yuan, J.** (2008) Identification of a molecular signaling network that regulates a cellular necrotic cell death pathway. *Cell*, **135**, 1311-1323.
- Hofius, D., Tsitsigiannis, D.I., Jones, J.D. and Mundy, J.** (2007) Inducible cell death in plant immunity. *Seminars in cancer biology*, **17**, 166-187.
- Hoisington, D.A., Neuffer, M.G. and Walbot, V.** (1982) Disease lesion mimics in maize. I. Effect of genetic background, temperature, developmental age, and wounding on necrotic spot formation with Les1. *Developmental biology*, **93**, 381-388.
- Humphreys, J.M., Hemm, M.R. and Chapple, C.** (1999) New routes for lignin biosynthesis defined by biochemical characterization of recombinant ferulate 5-hydroxylase, a multifunctional cytochrome P450-dependent monooxygenase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **96**, 10045-10050.
- Hung, C.Y., Aspesi, P., Jr., Hunter, M.R., Lomax, A.W. and Perera, I.Y.** (2014) Phosphoinositide-signaling is one component of a robust plant defense response. *Frontiers in plant science*, **5**, 267.
- Hunt, A.G.** (2014) The Arabidopsis polyadenylation factor subunit CPSF30 as conceptual link between mRNA polyadenylation and cellular signaling. *Current opinion in plant biology*, **21C**, 128-132.
- Hynes, A.C., Sreenan, J.M. and Kane, M.T.** (2000) Uptake and incorporation of myo-inositol by bovine preimplantation embryos from two-cell to early blastocyst stages. *Molecular reproduction and development*, **55**, 265-269.
- Ihara-Ohori, Y., Nagano, M., Muto, S., Uchimiya, H. and Kawai-Yamada, M.** (2007) Cell death suppressor Arabidopsis bax inhibitor-1 is associated with calmodulin binding and ion homeostasis. *Plant physiology*, **143**, 650-660.
- Ischebeck, T., Stenzel, I. and Heilmann, I.** (2008) Type B phosphatidylinositol-4-phosphate 5-kinases mediate Arabidopsis and Nicotiana tabacum pollen tube growth by regulating apical pectin secretion. *The Plant cell*, **20**, 3312-3330.
- Ishitani, M., Majumder, A.L., Bornhouser, A., Michalowski, C.B., Jensen, R.G. and Bohnert, H.J.** (1996) Coordinate transcriptional induction of myo-inositol metabolism during environmental stress. *The Plant journal : for cell and molecular biology*, **9**, 537-548.
- Ito, J. and Fukuda, H.** (2002) ZEN1 is a key enzyme in the degradation of nuclear DNA during programmed cell death of tracheary elements. *The Plant cell*, **14**, 3201-3211.
- Ivanova, A., Law, S.R., Narsai, R., Duncan, O., Lee, J.H., Zhang, B., Van Aken, O., Radomiljac, J.D., van der Merwe, M., Yi, K. and Whelan, J.** (2014) A Functional Antagonistic Relationship between Auxin and Mitochondrial Retrograde Signaling Regulates Alternative Oxidase1a Expression in Arabidopsis. *Plant physiology*, **165**, 1233-1254.

- James, D.G. and Price, T.S.** (2004) Field-testing of methyl salicylate for recruitment and retention of beneficial insects in grapes and hops. *Journal of chemical ecology*, **30**, 1613-1628.
- Johnson, M.D. and Sussex, I.M.** (1995) 1 L-myo-Inositol 1-Phosphate Synthase from *Arabidopsis thaliana*. *Plant physiology*, **107**, 613-619.
- Johnson, M.D. and Wang, X.** (1996) Differentially expressed forms of 1-L-myo-inositol-1-phosphate synthase (EC 5.5.1.4) in *Phaseolus vulgaris*. *The Journal of biological chemistry*, **271**, 17215-17218.
- Joshi, R., Ramanarao, M.V. and Baisakh, N.** (2013) *Arabidopsis* plants constitutively overexpressing a myo-inositol 1-phosphate synthase gene (SaINO1) from the halophyte smooth cordgrass exhibits enhanced level of tolerance to salt stress. *Plant physiology and biochemistry : PPB / Societe francaise de physiologie vegetale*, **65**, 61-66.
- Kale, S.D., Gu, B., Capelluto, D.G., Dou, D., Feldman, E., Rumore, A., Arredondo, F.D., Hanlon, R., Fudal, I., Rouxel, T., Lawrence, C.B., Shan, W. and Tyler, B.M.** (2010) External lipid PI3P mediates entry of eukaryotic pathogen effectors into plant and animal host cells. *Cell*, **142**, 284-295.
- Kanyuka, K., Praekelt, U., Franklin, K.A., Billingham, O.E., Hooley, R., Whitlam, G.C. and Halliday, K.J.** (2003) Mutations in the huge *Arabidopsis* gene BIG affect a range of hormone and light responses. *The Plant journal : for cell and molecular biology*, **35**, 57-70.
- Karner, U., Peterbauer, T., Raboy, V., Jones, D.A., Hedley, C.L. and Richter, A.** (2004) myo-Inositol and sucrose concentrations affect the accumulation of raffinose family oligosaccharides in seeds. *Journal of experimental botany*, **55**, 1981-1987.
- Kaur, H., Shukla, R.K., Yadav, G., Chattopadhyay, D. and Majee, M.** (2008) Two divergent genes encoding L-myo-inositol 1-phosphate synthase1 (CaMIPS1) and 2 (CaMIPS2) are differentially expressed in chickpea. *Plant, cell & environment*, **31**, 1701-1716.
- Kaur, H., Verma, P., Petla, B.P., Rao, V., Saxena, S.C. and Majee, M.** (2013) Ectopic expression of the ABA-inducible dehydration-responsive chickpea L-myo-inositol 1-phosphate synthase 2 (CaMIPS2) in *Arabidopsis* enhances tolerance to salinity and dehydration stress. *Planta*, **237**, 321-335.
- Kawai-Yamada, M., Jin, L., Yoshinaga, K., Hirata, A. and Uchimiya, H.** (2001) Mammalian Bax-induced plant cell death can be down-regulated by overexpression of *Arabidopsis* Bax Inhibitor-1 (AtBI-1). *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **98**, 12295-12300.
- Kawashima, T. and Goldberg, R.B.** (2010) The suspensor: not just suspending the embryo. *Trends in plant science*, **15**, 23-30.
- Keller, R., Brearley, C.A., Trethewey, R.N. and Muller-Rober, B.** (1998) Reduced inositol content and altered morphology in transgenic potato plants inhibited for 1D-myo-inositol 3-phosphate synthase. *Plant Journal*, **16**, 403-410.
- Kerr, J.F., Wyllie, A.H. and Currie, A.R.** (1972) Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *British journal of cancer*, **26**, 239-257.
- Keunen, E., Peshev, D., Vangronsveld, J., W, V.D.E. and Cuypers, A.** (2013) Plant sugars are crucial players in the oxidative challenge during abiotic stress: extending the traditional concept. *Plant, cell & environment*.
- Kim, C., Meskauskiene, R., Zhang, S., Lee, K.P., Lakshmanan Ashok, M., Blajicka, K., Herrfurth, C., Feussner, I. and Apel, K.** (2012) Chloroplasts of *Arabidopsis* are the source and a primary target of a plant-specific programmed cell death signaling pathway. *The Plant cell*, **24**, 3026-3039.
- Kim, H.R., Lee, G.H., Ha, K.C., Ahn, T., Moon, J.Y., Lee, B.J., Cho, S.G., Kim, S., Seo, Y.R., Shin, Y.J., Chae, S.W., Reed, J.C. and Chae, H.J.** (2008a) Bax Inhibitor-1 Is a

- pH-dependent regulator of Ca<sup>2+</sup> channel activity in the endoplasmic reticulum. *The Journal of biological chemistry*, **283**, 15946-15955.
- Kim, M.S., Cho, S.M., Kang, E.Y., Im, Y.J., Hwangbo, H., Kim, Y.C., Ryu, C.M., Yang, K.Y., Chung, G.C. and Cho, B.H.** (2008b) Galactinol Is a Signaling Component of the Induced Systemic Resistance Caused by *Pseudomonas chlororaphis* O6 Root Colonization. *Mol Plant Microbe In*, **21**, 1643-1653.
- Kim, S.I. and Tai, T.H.** (2011) Identification of genes necessary for wild-type levels of seed phytic acid in *Arabidopsis thaliana* using a reverse genetics approach. *Molecular genetics and genomics : MGG*, **286**, 119-133.
- Knaupp, M., Mishra, K.B., Nedbal, L. and Heyer, A.G.** (2011) Evidence for a role of raffinose in stabilizing photosystem II during freeze-thaw cycles. *Planta*, **234**, 477-486.
- Koussevitzky, S., Nott, A., Mockler, T.C., Hong, F., Sachetto-Martins, G., Surpin, M., Lim, J., Mittler, R. and Chory, J.** (2007) Signals from chloroplasts converge to regulate nuclear gene expression. *Science*, **316**, 715-719.
- Kowalczyk, S., Jakubowska, A., Zielinska, E. and Bandurski, R.S.** (2003) Bifunctional indole-3-acetyl transferase catalyses synthesis and hydrolysis of indole-3-acetyl-myo-inositol in immature endosperm of *Zea mays*. *Physiologia plantarum*, **119**, 165-174.
- Krecek, P., Skupa, P., Libus, J., Naramoto, S., Tejos, R., Friml, J. and Zazimalova, E.** (2009) The PIN-FORMED (PIN) protein family of auxin transporters. *Genome Biol*, **10**.
- Kroemer, G. and Levine, B.** (2008) Autophagic cell death: the story of a misnomer. *Nature reviews. Molecular cell biology*, **9**, 1004-1010.
- Kroemer, G., Galluzzi, L., Vandenabeele, P., Abrams, J., Alnemri, E.S., Baehrecke, E.H., Blagosklonny, M.V., El-Deiry, W.S., Golstein, P., Green, D.R., Hengartner, M., Knight, R.A., Kumar, S., Lipton, S.A., Malorni, W., Nunez, G., Peter, M.E., Tschopp, J., Yuan, J., Piacentini, M., Zhivotovsky, B., Melino, G. and Nomenclature Committee on Cell, D.** (2009) Classification of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2009. *Cell death and differentiation*, **16**, 3-11.
- Kubo, M., Udagawa, M., Nishikubo, N., Horiguchi, G., Yamaguchi, M., Ito, J., Mimura, T., Fukuda, H. and Demura, T.** (2005) Transcription switches for protoxylem and metaxylem vessel formation. *Genes & development*, **19**, 1855-1860.
- Kunikowska, A., Byczkowska, A., Doniak, M. and Kazmierczak, A.** (2013) Cytokinins resume: their signaling and role in programmed cell death in plants. *Plant cell reports*, **32**, 771-780.
- Kuroyanagi, M., Yamada, K., Hatsugai, N., Kondo, M., Nishimura, M. and Hara-Nishimura, I.** (2005) Vacuolar processing enzyme is essential for mycotoxin-induced cell death in *Arabidopsis thaliana*. *The Journal of biological chemistry*, **280**, 32914-32920.
- Kusano, H., Testerink, C., Vermeer, J.E., Tsuge, T., Shimada, H., Oka, A., Munnik, T. and Aoyama, T.** (2008) The *Arabidopsis* Phosphatidylinositol Phosphate 5-Kinase PIP5K3 is a key regulator of root hair tip growth. *The Plant cell*, **20**, 367-380.
- Lacomme, C. and Santa Cruz, S.** (1999) Bax-induced cell death in tobacco is similar to the hypersensitive response. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **96**, 7956-7961.
- Lalanne, E., Honys, D., Johnson, A., Borner, G.H., Lilley, K.S., Dupree, P., Grossniklaus, U. and Twell, D.** (2004) SETH1 and SETH2, two components of the glycosylphosphatidylinositol anchor biosynthetic pathway, are required for pollen germination and tube growth in *Arabidopsis*. *The Plant cell*, **16**, 229-240.
- Larson, S.R. and Raboy, V.** (1999) Linkage mapping of maize and barley myo-inositol 1-phosphate synthase DNA sequences: correspondence with a low phytic acid mutation. *Theoretical and Applied Genetics*, **99**, 27-36.

- Latrasse, D., Jegu, T., Meng, P.H., Mazubert, C., Hudik, E., Delarue, M., Charon, C., Crespi, M., Hirt, H., Raynaud, C., Bergounioux, C. and Benhamed, M.** (2013) Dual function of MIPS1 as a metabolic enzyme and transcriptional regulator. *Nucleic acids research*, **41**, 2907-2917.
- Lee, K.P., Kim, C., Landgraf, F. and Apel, K.** (2007) EXECUTER1- and EXECUTER2-dependent transfer of stress-related signals from the plastid to the nucleus of *Arabidopsis thaliana*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **104**, 10270-10275.
- Lemtiri-Chlieh, F., MacRobbie, E.A., Webb, A.A., Manison, N.F., Brownlee, C., Skepper, J.N., Chen, J., Prestwich, G.D. and Brearley, C.A.** (2003) Inositol hexakisphosphate mobilizes an endomembrane store of calcium in guard cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **100**, 10091-10095.
- Lesniewicz, K., Karlowski, W.M., Pienkowska, J.R., Krzywkowski, P. and Poreba, E.** (2013) The plant s1-like nuclease family has evolved a highly diverse range of catalytic capabilities. *Plant & cell physiology*, **54**, 1064-1078.
- Li, H.M., Altschmied, L. and Chory, J.** (1994) *Arabidopsis* mutants define downstream branches in the phototransduction pathway. *Genes & development*, **8**, 339-349.
- Li, J., Besseau, S., Toronen, P., Sipari, N., Kollist, H., Holm, L. and Palva, E.T.** (2013) Defense-related transcription factors WRKY70 and WRKY54 modulate osmotic stress tolerance by regulating stomatal aperture in *Arabidopsis*. *The New phytologist*, **200**, 457-472.
- Li, J., Brader, G. and Palva, E.T.** (2004) The WRKY70 transcription factor: a node of convergence for jasmonate-mediated and salicylate-mediated signals in plant defense. *The Plant cell*, **16**, 319-331.
- Loewus, F.A. and Loewus, M.W.** (1983) Myoinositol - Its Biosynthesis and Metabolism. *Annu Rev Plant Phys*, **34**, 137-161.
- Loewus, F.A. and Murthy, P.P.N.** (2000) myo-inositol metabolism in plants. *Plant Sci*, **150**, 1-19.
- Loewus, F.A., Kelly, S. and Neufeld, E.F.** (1962) Metabolism of Myo-Inositol in Plants: Conversion to Pectin, Hemicellulose, D-Xylose, and Sugar Acids. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **48**, 421-425.
- Lopez-Bucio, J., Hernandez-Abreu, E., Sanchez-Calderon, L., Perez-Torres, A., Rampey, R.A., Bartel, B. and Herrera-Estrella, L.** (2005) An auxin transport independent pathway is involved in phosphate stress-induced root architectural alterations in *Arabidopsis*. Identification of BIG as a mediator of auxin in pericycle cell activation. *Plant physiology*, **137**, 681-691.
- Lorence, A., Chevone, B.I., Mendes, P. and Nessler, C.L.** (2004) myo-inositol oxygenase offers a possible entry point into plant ascorbate biosynthesis. *Plant physiology*, **134**, 1200-1205.
- Lorrain, S., Vaillau, F., Balagué, C. and Roby, D.** (2003) Lesion mimic mutants: keys for deciphering cell death and defense pathways in plants? *Trends in plant science*, **8**, 263-271.
- Ludwig-Muller, J.** (2011) Auxin conjugates: their role for plant development and in the evolution of land plants. *Journal of experimental botany*, **62**, 1757-1773.
- Luo, Y., Qin, G., Zhang, J., Liang, Y., Song, Y., Zhao, M., Tsuge, T., Aoyama, T., Liu, J., Gu, H. and Qu, L.J.** (2011) D-myo-inositol-3-phosphate affects phosphatidylinositol-mediated endomembrane function in *Arabidopsis* and is essential for auxin-regulated embryogenesis. *The Plant cell*, **23**, 1352-1372.
- Lyzenga, W.J. and Stone, S.L.** (2012) Regulation of ethylene biosynthesis through protein degradation. *Plant signaling & behavior*, **7**, 1438-1442.



- Majee, M., Maitra, S., Dastidar, K.G., Pattnaik, S., Chatterjee, A., Hait, N.C., Das, K.P. and Majumder, A.L.** (2004) A novel salt-tolerant L-myo-inositol-1-phosphate synthase from *Porteresia coarctata* (Roxb.) Tateoka, a halophytic wild rice: molecular cloning, bacterial overexpression, characterization, and functional introgression into tobacco-conferring salt tolerance phenotype. *The Journal of biological chemistry*, **279**, 28539-28552.
- Majumder, A.L., Chatterjee, A., Ghosh Dastidar, K. and Majee, M.** (2003) Diversification and evolution of L-myo-inositol 1-phosphate synthase. *FEBS Letters*, **553**, 3-10.
- Markham, J.E., Lynch, D.V., Napier, J.A., Dunn, T.M. and Cahoon, E.B.** (2013) Plant sphingolipids: function follows form. *Current opinion in plant biology*, **16**, 350-357.
- Mateo, A., Muhlenbock, P., Rusterucci, C., Chang, C.C., Miszalski, Z., Karpinska, B., Parker, J.E., Mullineaux, P.M. and Karpinski, S.** (2004) LESION SIMULATING DISEASE 1 is required for acclimation to conditions that promote excess excitation energy. *Plant physiology*, **136**, 2818-2830.
- Mellwain, D.R., Berger, T. and Mak, T.W.** (2013) Caspase functions in cell death and disease. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, **5**, a008656.
- Mei, Y., Jia, W.J., Chu, Y.J. and Xue, H.W.** (2012) Arabidopsis phosphatidylinositol monophosphate 5-kinase 2 is involved in root gravitropism through regulation of polar auxin transport by affecting the cycling of PIN proteins. *Cell research*, **22**, 581-597.
- Melotto, M., Underwood, W., Koczan, J., Nomura, K. and He, S.Y.** (2006) Plant stomata function in innate immunity against bacterial invasion. *Cell*, **126**, 969-980.
- Meng, P.H., Raynaud, C., Tcherkez, G., Blanchet, S., Massoud, K., Domenichini, S., Henry, Y., Soubigou-Taconnat, L., Lelarge-Trouverie, C., Saindrenan, P., Renou, J.P. and Bergounioux, C.** (2009) Crosstalks between Myo-Inositol Metabolism, Programmed Cell Death and Basal Immunity in Arabidopsis. *Plos One*, **4**.
- Merchante, C., Alonso, J.M. and Stepanova, A.N.** (2013) Ethylene signaling: simple ligand, complex regulation. *Current opinion in plant biology*, **16**, 554-560.
- Michaeli, S., Avin-Wittenberg, T. and Galili, G.** (2014) Involvement of autophagy in the direct ER to vacuole protein trafficking route in plants. *Frontiers in plant science*, **5**, 134.
- Michell, R.H.** (2008) Inositol derivatives: evolution and functions. *Nature reviews. Molecular cell biology*, **9**, 151-161.
- Michell, R.H.** (2013) Inositol lipids: from an archaeal origin to phosphatidylinositol 3,5-bisphosphate faults in human disease. *The FEBS journal*, **280**, 6281-6294.
- Millar, A.A. and Gubler, F.** (2005) The Arabidopsis GAMBYB-like genes, MYB33 and MYB65, are MicroRNA-regulated genes that redundantly facilitate anther development. *The Plant cell*, **17**, 705-721.
- Miller, B.L., Moats, R.A., Shonk, T., Ernst, T., Woolley, S. and Ross, B.D.** (1993) Alzheimer disease: depiction of increased cerebral myo-inositol with proton MR spectroscopy. *Radiology*, **187**, 433-437.
- Mitsuhashi, N., Kondo, M., Nakaune, S., Ohnishi, M., Hayashi, M., Hara-Nishimura, I., Richardson, A., Fukaki, H., Nishimura, M. and Mimura, T.** (2008) Localization of myo-inositol-1-phosphate synthase to the endosperm in developing seeds of Arabidopsis. *Journal of experimental botany*, **59**, 3069-3076.
- Miura, K. and Tada, Y.** (2014) Regulation of water, salinity, and cold stress responses by salicylic acid. *Frontiers in plant science*, **5**, 4.
- Mochizuki, N., Brusslan, J.A., Larkin, R., Nagatani, A. and Chory, J.** (2001) Arabidopsis genomes uncoupled 5 (GUN5) mutant reveals the involvement of Mg-chelatase H subunit in plastid-to-nucleus signal transduction. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **98**, 2053-2058.
- Moller, B. and Weijers, D.** (2009) Auxin control of embryo patterning. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, **1**, a001545.

- Moore, B., Zhou, L., Rolland, F., Hall, Q., Cheng, W.H., Liu, Y.X., Hwang, I., Jones, T. and Sheen, J.** (2003) Role of the Arabidopsis glucose sensor HXK1 in nutrient, light, and hormonal signaling. *Science*, **300**, 332-336.
- Mosblech, A., Konig, S., Stenzel, I., Grzeganeck, P., Feussner, I. and Heilmann, I.** (2008) Phosphoinositide and inositolpolyphosphate signalling in defense responses of Arabidopsis thaliana challenged by mechanical wounding. *Molecular plant*, **1**, 249-261.
- Mosblech, A., Thurow, C., Gatz, C., Feussner, I. and Heilmann, I.** (2011) Jasmonic acid perception by COI1 involves inositol polyphosphates in Arabidopsis thaliana. *The Plant journal : for cell and molecular biology*, **65**, 949-957.
- Mou, Z., Fan, W. and Dong, X.** (2003) Inducers of plant systemic acquired resistance regulate NPR1 function through redox changes. *Cell*, **113**, 935-944.
- Mueller-Roeber, B. and Pical, C.** (2002) Inositol phospholipid metabolism in Arabidopsis. Characterized and putative isoforms of inositol phospholipid kinase and phosphoinositide-specific phospholipase C. *Plant physiology*, **130**, 22-46.
- Muntz, K.** (2007) Protein dynamics and proteolysis in plant vacuoles. *Journal of experimental botany*, **58**, 2391-2407.
- Murphy, A.M., Otto, B., Brearley, C.A., Carr, J.P. and Hanke, D.E.** (2008) A role for inositol hexakisphosphate in the maintenance of basal resistance to plant pathogens. *The Plant journal : for cell and molecular biology*, **56**, 638-652.
- Nagano, M., Ihara-Ohori, Y., Imai, H., Inada, N., Fujimoto, M., Tsutsumi, N., Uchimiya, H. and Kawai-Yamada, M.** (2009) Functional association of cell death suppressor, Arabidopsis Bax inhibitor-1, with fatty acid 2-hydroxylation through cytochrome b(5). *The Plant journal : for cell and molecular biology*, **58**, 122-134.
- Nagata, N., Tanaka, R., Satoh, S. and Tanaka, A.** (2005) Identification of a vinyl reductase gene for chlorophyll synthesis in Arabidopsis thaliana and implications for the evolution of Prochlorococcus species. *The Plant cell*, **17**, 233-240.
- Nakanishi, H., Nozue, H., Suzuki, K., Kaneko, Y., Taguchi, G. and Hayashida, N.** (2005) Characterization of the Arabidopsis thaliana mutant pcb2 which accumulates divinyl chlorophylls. *Plant & cell physiology*, **46**, 467-473.
- Navarro, L., Bari, R., Achard, P., Lison, P., Nemri, A., Harberd, N.P. and Jones, J.D.** (2008) DELLAs control plant immune responses by modulating the balance of jasmonic acid and salicylic acid signaling. *Current biology : CB*, **18**, 650-655.
- Nawrath, C. and Metraux, J.P.** (1999) Salicylic acid induction-deficient mutants of Arabidopsis express PR-2 and PR-5 and accumulate high levels of camalexin after pathogen inoculation. *The Plant cell*, **11**, 1393-1404.
- Ndamukong, I., Jones, D.R., Lapko, H., Divecha, N. and Avramova, Z.** (2010) Phosphatidylinositol 5-phosphate links dehydration stress to the activity of ARABIDOPSIS TRITHORAX-LIKE factor ATX1. *Plos One*, **5**, e13396.
- Nelson, D.E., Koukoumanos, M. and Bohnert, H.J.** (1999) Myo-inositol-dependent sodium uptake in ice plant. *Plant physiology*, **119**, 165-172.
- Nie, H., Zhao, C., Wu, G., Wu, Y., Chen, Y. and Tang, D.** (2012) SR1, a calmodulin-binding transcription factor, modulates plant defense and ethylene-induced senescence by directly regulating NDR1 and EIN3. *Plant physiology*, **158**, 1847-1859.
- Nishizawa, A., Yabuta, Y. and Shigeoka, S.** (2008) Galactinol and raffinose constitute a novel function to protect plants from oxidative damage. *Plant physiology*, **147**, 1251-1263.
- Nunes, A.C., Vianna, G.R., Cuneo, F., Amaya-Farfan, J., de Capdeville, G., Rech, E.L. and Aragao, F.J.** (2006) RNAi-mediated silencing of the myo-inositol-1-phosphate synthase gene (GmMIPS1) in transgenic soybean inhibited seed development and reduced phytate content. *Planta*, **224**, 125-132.

- O'Brien, L.E., Zegers, M.M. and Mostov, K.E.** (2002) Opinion: Building epithelial architecture: insights from three-dimensional culture models. *Nature reviews. Molecular cell biology*, **3**, 531-537.
- Pajerowska-Mukhtar, K.M., Emerine, D.K. and Mukhtar, M.S.** (2013) Tell me more: roles of NPRs in plant immunity. *Trends in plant science*, **18**, 402-411.
- Pandey, S.P., Roccaro, M., Schon, M., Logemann, E. and Somssich, I.E.** (2010) Transcriptional reprogramming regulated by WRKY18 and WRKY40 facilitates powdery mildew infection of Arabidopsis. *The Plant journal : for cell and molecular biology*, **64**, 912-923.
- Papaleo, E., Unfer, V., Baillargeon, J.P. and Chiu, T.T.** (2009) Contribution of myo-inositol to reproduction. *European journal of obstetrics, gynecology, and reproductive biology*, **147**, 120-123.
- Park, J.H., Halitschke, R., Kim, H.B., Baldwin, I.T., Feldmann, K.A. and Feyereisen, R.** (2002) A knock-out mutation in allene oxide synthase results in male sterility and defective wound signal transduction in Arabidopsis due to a block in jasmonic acid biosynthesis. *The Plant journal : for cell and molecular biology*, **31**, 1-12.
- Park, S.W., Kaimoyo, E., Kumar, D., Mosher, S. and Klessig, D.F.** (2007) Methyl salicylate is a critical mobile signal for plant systemic acquired resistance. *Science*, **318**, 113-116.
- Parker, J.E., Holub, E.B., Frost, L.N., Falk, A., Gunn, N.D. and Daniels, M.J.** (1996) Characterization of eds1, a mutation in Arabidopsis suppressing resistance to *Peronospora parasitica* specified by several different RPP genes. *The Plant cell*, **8**, 2033-2046.
- Pei, W., Du, F., Zhang, Y., He, T. and Ren, H.** (2012) Control of the actin cytoskeleton in root hair development. *Plant science : an international journal of experimental plant biology*, **187**, 10-18.
- Peiter, E.** (2011) The plant vacuole: emitter and receiver of calcium signals. *Cell calcium*, **50**, 120-128.
- Penninckx, I.A., Thomma, B.P., Buchala, A., Metraux, J.P. and Broekaert, W.F.** (1998) Concomitant activation of jasmonate and ethylene response pathways is required for induction of a plant defensin gene in Arabidopsis. *The Plant cell*, **10**, 2103-2113.
- Perez-Amador, M.A., Abler, M.L., De Rocher, E.J., Thompson, D.M., van Hoof, A., LeBrasseur, N.D., Lers, A. and Green, P.J.** (2000) Identification of BFN1, a bifunctional nuclease induced during leaf and stem senescence in Arabidopsis. *Plant physiology*, **122**, 169-180.
- Petersen, M., Brodersen, P., Naested, H., Andreasson, E., Lindhart, U., Johansen, B., Nielsen, H.B., Lacy, M., Austin, M.J., Parker, J.E., Sharma, S.B., Klessig, D.F., Martienssen, R., Mattsson, O., Jensen, A.B. and Mundy, J.** (2000) Arabidopsis map kinase 4 negatively regulates systemic acquired resistance. *Cell*, **103**, 1111-1120.
- Pieterse, C.M., Leon-Reyes, A., Van der Ent, S. and Van Wees, S.C.** (2009) Networking by small-molecule hormones in plant immunity. *Nature chemical biology*, **5**, 308-316.
- Pieterse, C.M., Van der Does, D., Zamioudis, C., Leon-Reyes, A. and Van Wees, S.C.** (2012) Hormonal modulation of plant immunity. *Annual review of cell and developmental biology*, **28**, 489-521.
- Pilloff, R.K., Devadas, S.K., Enyedi, A. and Raina, R.** (2002) The Arabidopsis gain-of-function mutant dll1 spontaneously develops lesions mimicking cell death associated with disease. *The Plant journal : for cell and molecular biology*, **30**, 61-70.
- Portt, L., Norman, G., Clapp, C., Greenwood, M. and Greenwood, M.T.** (2011) Anti-apoptosis and cell survival: a review. *Biochimica et biophysica acta*, **1813**, 238-259.
- Preuss, M.L., Schmitz, A.J., Thole, J.M., Bonner, H.K., Otegui, M.S. and Nielsen, E.** (2006) A role for the RabA4b effector protein PI-4Kbeta1 in polarized expansion of root hair cells in Arabidopsis thaliana. *The Journal of cell biology*, **172**, 991-998.

- Putney, J.W.** (2009) Capacitative calcium entry: from concept to molecules. *Immunological reviews*, **231**, 10-22.
- Qi, X., Bao, F.S. and Xie, Z.** (2009) Small RNA deep sequencing reveals role for *Arabidopsis thaliana* RNA-dependent RNA polymerases in viral siRNA biogenesis. *Plos One*, **4**, e4971.
- Qiu, J.L., Fiil, B.K., Petersen, K., Nielsen, H.B., Botanga, C.J., Thorgrimsen, S., Palma, K., Suarez-Rodriguez, M.C., Sandbech-Clausen, S., Lichota, J., Brodersen, P., Grasser, K.D., Mattsson, O., Glazebrook, J., Mundy, J. and Petersen, M.** (2008) *Arabidopsis* MAP kinase 4 regulates gene expression through transcription factor release in the nucleus. *The EMBO journal*, **27**, 2214-2221.
- Queval, G. and Noctor, G.** (2007) A plate reader method for the measurement of NAD, NADP, glutathione, and ascorbate in tissue extracts: Application to redox profiling during *Arabidopsis* rosette development. *Analytical biochemistry*, **363**, 58-69.
- Queval, G., Issakidis-Bourguet, E., Hoerberichts, F.A., Vidorpe, M., Gakiere, B., Vanacker, H., Miginiac-Maslow, M., Van Breusegem, F. and Noctor, G.** (2007) Conditional oxidative stress responses in the *Arabidopsis* photorespiratory mutant *cat2* demonstrate that redox state is a key modulator of daylength-dependent gene expression, and define photoperiod as a crucial factor in the regulation of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced cell death. *The Plant journal : for cell and molecular biology*, **52**, 640-657.
- Raboy, V.** (2001) Seeds for a better future: 'low phytate' grains help to overcome malnutrition and reduce pollution. *Trends in plant science*, **6**, 458-462.
- Raboy, V., Gerbasi, P.F., Young, K.A., Stoneberg, S.D., Pickett, S.G., Bauman, A.T., Murthy, P.P., Sheridan, W.F. and Ertl, D.S.** (2000) Origin and seed phenotype of maize low phytic acid 1-1 and low phytic acid 2-1. *Plant physiology*, **124**, 355-368.
- RayChaudhuri, A., Hait, N.C., Dasgupta, S., Bhaduri, T.J., Deb, R. and Majumder, A.L.** (1997) L-myo-Inositol 1-Phosphate Synthase from Plant Sources (Characteristics of the Chloroplastic and Cytosolic Enzymes). *Plant physiology*, **115**, 727-736.
- Reape, T.J. and McCabe, P.F.** (2008) Apoptotic-like programmed cell death in plants. *The New phytologist*, **180**, 13-26.
- Roberts, I.N., Caputo, C., Criado, M.V. and Funk, C.** (2012) Senescence-associated proteases in plants. *Physiologia plantarum*, **145**, 130-139.
- Roberts, K. and McCann, M.C.** (2000) Xylogenesis: the birth of a corpse. *Current opinion in plant biology*, **3**, 517-522.
- Robert-Seilantantz, A., Grant, M. and Jones, J.D.** (2011) Hormone crosstalk in plant disease and defense: more than just jasmonate-salicylate antagonism. *Annual review of phytopathology*, **49**, 317-343.
- Rolland, F., Baena-Gonzalez, E. and Sheen, J.** (2006) Sugar sensing and signaling in plants: conserved and novel mechanisms. *Annual review of plant biology*, **57**, 675-709.
- Roudier, F., Fernandez, A.G., Fujita, M., Himmelspach, R., Borner, G.H., Schindelman, G., Song, S., Baskin, T.I., Dupree, P., Wasteneys, G.O. and Benfey, P.N.** (2005) COBRA, an *Arabidopsis* extracellular glycosyl-phosphatidyl inositol-anchored protein, specifically controls highly anisotropic expansion through its involvement in cellulose microfibril orientation. *The Plant cell*, **17**, 1749-1763.
- Ruegger, M., Dewey, E., Hobbie, L., Brown, D., Bernasconi, P., Turner, J., Muday, G. and Estelle, M.** (1997) Reduced naphthylphthalamic acid binding in the *tir3* mutant of *Arabidopsis* is associated with a reduction in polar auxin transport and diverse morphological defects. *The Plant cell*, **9**, 745-757.
- Rushton, P.J., Somssich, I.E., Ringler, P. and Shen, Q.J.** (2010) WRKY transcription factors. *Trends in plant science*, **15**, 247-258.

- Sakakibara, H.** (2006) Cytokinins: activity, biosynthesis, and translocation. *Annual review of plant biology*, **57**, 431-449.
- Sakamoto, W. and Takami, T.** (2014) Nucleases in higher plants and their possible involvement in DNA degradation during leaf senescence. *Journal of experimental botany*, **65**, 3835-3843.
- Sanmartin, M., Jaroszewski, L., Raikhel, N.V. and Rojo, E.** (2005) Caspases. Regulating death since the origin of life. *Plant physiology*, **137**, 841-847.
- Sarkar, S., Floto, R.A., Berger, Z., Imarisio, S., Cordenier, A., Pasco, M., Cook, L.J. and Rubinsztein, D.C.** (2005) Lithium induces autophagy by inhibiting inositol monophosphatase. *The Journal of cell biology*, **170**, 1101-1111.
- Sato, Y., Yazawa, K., Yoshida, S., Tamaoki, M., Nakajima, N., Iwai, H., Ishii, T. and Satoh, S.** (2011) Expression and functions of myo-inositol monophosphatase family genes in seed development of Arabidopsis. *Journal of plant research*, **124**, 385-394.
- Shaltiel, G., Shamir, A., Shapiro, J., Ding, D., Dalton, E., Bialer, M., Harwood, A.J., Belmaker, R.H., Greenberg, M.L. and Agam, G.** (2004) Valproate decreases inositol biosynthesis. *Biological psychiatry*, **56**, 868-874.
- Sharpley, S.C. and Fry, S.C.** (2007) Radioisotope ratios discriminate between competing pathways of cell wall polysaccharide and RNA biosynthesis in living plant cells. *The Plant journal : for cell and molecular biology*, **52**, 252-262.
- Sheard, L.B., Tan, X., Mao, H., Withers, J., Ben-Nissan, G., Hinds, T.R., Kobayashi, Y., Hsu, F.F., Sharon, M., Browse, J., He, S.Y., Rizo, J., Howe, G.A. and Zheng, N.** (2010) Jasmonate perception by inositol-phosphate-potentiated COI1-JAZ co-receptor. *Nature*, **468**, 400-405.
- Shen, Y., Venu, R.C., Nobuta, K., Wu, X., Notibala, V., Demirci, C., Meyers, B.C., Wang, G.L., Ji, G. and Li, Q.Q.** (2011) Transcriptome dynamics through alternative polyadenylation in developmental and environmental responses in plants revealed by deep sequencing. *Genome research*, **21**, 1478-1486.
- Sherstnev, A., Duc, C., Cole, C., Zacharaki, V., Hornyik, C., Ozsolak, F., Milos, P.M., Barton, G.J. and Simpson, G.G.** (2012) Direct sequencing of Arabidopsis thaliana RNA reveals patterns of cleavage and polyadenylation. *Nature structural & molecular biology*, **19**, 845-852.
- Shi, L., Bielawski, J., Mu, J., Dong, H., Teng, C., Zhang, J., Yang, X., Tomishige, N., Hanada, K., Hannun, Y.A. and Zuo, J.** (2007) Involvement of sphingoid bases in mediating reactive oxygen intermediate production and programmed cell death in Arabidopsis. *Cell research*, **17**, 1030-1040.
- Simon, C., Langlois-Meurinne, M., Bellvert, F., Garmier, M., Didierlaurent, L., Massoud, K., Chaouch, S., Marie, A., Bodo, B., Kauffmann, S., Noctor, G. and Saindrenan, P.** (2010) The differential spatial distribution of secondary metabolites in Arabidopsis leaves reacting hypersensitively to *Pseudomonas syringae* pv. tomato is dependent on the oxidative burst. *Journal of experimental botany*, **61**, 3355-3370.
- Smart, C.C. and Fleming, A.J.** (1993) A plant gene with homology to D-myo-inositol-3-phosphate synthase is rapidly and spatially up-regulated during an abscisic-acid-induced morphogenic response in *Spirodela polyrrhiza*. *The Plant journal : for cell and molecular biology*, **4**, 279-293.
- Smertenko, A. and Bozhkov, P.V.** (2014) Somatic embryogenesis: life and death processes during apical-basal patterning. *Journal of experimental botany*, **65**, 1343-1360.
- Sperling, P. and Heinz, E.** (2003) Plant sphingolipids: structural diversity, biosynthesis, first genes and functions. *Biochimica et biophysica acta*, **1632**, 1-15.

- Spoel, S.H., Johnson, J.S. and Dong, X.** (2007) Regulation of tradeoffs between plant defenses against pathogens with different lifestyles. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **104**, 18842-18847.
- Staswick, P.E.** (2008) JAZing up jasmonate signaling. *Trends in plant science*, **13**, 66-71.
- Staswick, P.E., Yuen, G.Y. and Lehman, C.C.** (1998) Jasmonate signaling mutants of *Arabidopsis* are susceptible to the soil fungus *Pythium irregulare*. *The Plant journal : for cell and molecular biology*, **15**, 747-754.
- Stein, A.J. and Geiger, J.H.** (2002) The crystal structure and mechanism of 1-L-myo-inositol-1-phosphate synthase. *The Journal of biological chemistry*, **277**, 9484-9491.
- Stevenson, J.M., Perera, I.Y., Heilmann, I.I., Persson, S. and Boss, W.F.** (2000) Inositol signaling and plant growth. *Trends in plant science*, **5**, 357.
- Strawn, M.A., Marr, S.K., Inoue, K., Inada, N., Zubieta, C. and Wildermuth, M.C.** (2007) *Arabidopsis* isochorismate synthase functional in pathogen-induced salicylate biosynthesis exhibits properties consistent with a role in diverse stress responses. *The Journal of biological chemistry*, **282**, 5919-5933.
- Sulston, J.E.** (1976) Post-embryonic development in the ventral cord of *Caenorhabditis elegans*. *Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences*, **275**, 287-297.
- Taji, T., Ohsumi, C., Iuchi, S., Seki, M., Kasuga, M., Kobayashi, M., Yamaguchi-Shinozaki, K. and Shinozaki, K.** (2002) Important roles of drought- and cold-inducible genes for galactinol synthase in stress tolerance in *Arabidopsis thaliana*. *The Plant journal : for cell and molecular biology*, **29**, 417-426.
- Tan, J., Wang, C., Xiang, B., Han, R. and Guo, Z.** (2013) Hydrogen peroxide and nitric oxide mediated cold- and dehydration-induced myo-inositol phosphate synthase that confers multiple resistances to abiotic stresses. *Plant, cell & environment*, **36**, 288-299.
- Tan, X., Calderon-Villalobos, L.I.A., Sharon, M., Zheng, C., Robinson, C.V., Estelle, M. and Zheng, N.** (2007) Mechanism of auxin perception by the TIR1 ubiquitin ligase. *Nature*, **446**, 640-645.
- Tang, D., Christiansen, K.M. and Innes, R.W.** (2005) Regulation of plant disease resistance, stress responses, cell death, and ethylene signaling in *Arabidopsis* by the EDR1 protein kinase. *Plant physiology*, **138**, 1018-1026.
- Tata, J.R.** (1966) Requirement for RNA and protein synthesis for induced regression of the tadpole tail in organ culture. *Developmental biology*, **13**, 77-94.
- Taylor, J., Williams, M.E., and Zhong, Y.** (January 11, 2012). The End: Senescence and Cell Death. Teaching Tools in Plant Biology: Lecture Notes. The Plant Cell (online)
- Taylor, R.C., Cullen, S.P. and Martin, S.J.** (2008) Apoptosis: controlled demolition at the cellular level. *Nature reviews. Molecular cell biology*, **9**, 231-241.
- Thole, J.M., Vermeer, J.E., Zhang, Y., Gadella, T.W., Jr. and Nielsen, E.** (2008) Root hair defective4 encodes a phosphatidylinositol-4-phosphate phosphatase required for proper root hair development in *Arabidopsis thaliana*. *The Plant cell*, **20**, 381-395.
- Thomas, P.E., Wu, X., Liu, M., Gaffney, B., Ji, G., Li, Q.Q. and Hunt, A.G.** (2012) Genome-wide control of polyadenylation site choice by CPSF30 in *Arabidopsis*. *The Plant cell*, **24**, 4376-4388.
- Thomas, S.G. and Franklin-Tong, V.E.** (2004) Self-incompatibility triggers programmed cell death in *Papaver* pollen. *Nature*, **429**, 305-309.
- Ton, J., Flors, V. and Mauch-Mani, B.** (2009) The multifaceted role of ABA in disease resistance. *Trends in plant science*, **14**, 310-317.
- Torabinejad, J., Donahue, J.L., Gunesequera, B.N., Allen-Daniels, M.J. and Gillaspay, G.E.** (2009) VTC4 is a bifunctional enzyme that affects myoinositol and ascorbate biosynthesis in plants. *Plant physiology*, **150**, 951-961.

- Truman, W.M., Bennett, M.H., Turnbull, C.G. and Grant, M.R.** (2010) Arabidopsis auxin mutants are compromised in systemic acquired resistance and exhibit aberrant accumulation of various indolic compounds. *Plant physiology*, **152**, 1562-1573.
- Tsiatsiani, L., Van Breusegem, F., Gallois, P., Zaviyalov, A., Lam, E. and Bozhkov, P.V.** (2011) Metacaspases. *Cell death and differentiation*, **18**, 1279-1288.
- Uren, A.G., O'Rourke, K., Aravind, L.A., Pisabarro, M.T., Seshagiri, S., Koonin, E.V. and Dixit, V.M.** (2000) Identification of paracaspases and metacaspases: two ancient families of caspase-like proteins, one of which plays a key role in MALT lymphoma. *Molecular cell*, **6**, 961-967.
- Vacca, R.A., Valenti, D., Bobba, A., Merafina, R.S., Passarella, S. and Marra, E.** (2006) Cytochrome c is released in a reactive oxygen species-dependent manner and is degraded via caspase-like proteases in tobacco Bright-Yellow 2 cells en route to heat shock-induced cell death. *Plant physiology*, **141**, 208-219.
- Valluru, R. and Van den Ende, W.** (2011) Myo-inositol and beyond--emerging networks under stress. *Plant science : an international journal of experimental plant biology*, **181**, 387-400.
- van Doorn, W.G.** (2011) Classes of programmed cell death in plants, compared to those in animals. *Journal of experimental botany*, **62**, 4749-4761.
- van Doorn, W.G. and Woltering, E.J.** (2005) Many ways to exit? Cell death categories in plants. *Trends in plant science*, **10**, 117-122.
- van Doorn, W.G., Beers, E.P., Dangel, J.L., Franklin-Tong, V.E., Gallois, P., Hara-Nishimura, I., Jones, A.M., Kawai-Yamada, M., Lam, E., Mundy, J., Mur, L.A., Petersen, M., Smertenko, A., Taliansky, M., Van Breusegem, F., Wolpert, T., Woltering, E., Zhivotovsky, B. and Bozhkov, P.V.** (2011) Morphological classification of plant cell deaths. *Cell death and differentiation*, **18**, 1241-1246.
- van Loon, L.C., Geraats, B.P. and Linthorst, H.J.** (2006a) Ethylene as a modulator of disease resistance in plants. *Trends in plant science*, **11**, 184-191.
- van Loon, L.C., Rep, M. and Pieterse, C.M.** (2006b) Significance of inducible defense-related proteins in infected plants. *Annual review of phytopathology*, **44**, 135-162.
- Vercammen, D., van de Cotte, B., De Jaeger, G., Eeckhout, D., Casteels, P., Vandepoele, K., Vandenbergh, I., Van Beeumen, J., Inze, D. and Van Breusegem, F.** (2004) Type II metacaspases Atmc4 and Atmc9 of Arabidopsis thaliana cleave substrates after arginine and lysine. *The Journal of biological chemistry*, **279**, 45329-45336.
- Vi, S.L., Trost, G., Lange, P., Czesnick, H., Rao, N., Lieber, D., Laux, T., Gray, W.M., Manley, J.L., Groth, D., Kappel, C. and Lenhard, M.** (2013) Target specificity among canonical nuclear poly(A) polymerases in plants modulates organ growth and pathogen response. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **110**, 13994-13999.
- Vogel, M.O., Moore, M., Konig, K., Pecher, P., Alsharafa, K., Lee, J. and Dietz, K.J.** (2014) Fast retrograde signaling in response to high light involves metabolite export, MITOGEN-ACTIVATED PROTEIN KINASE6, and AP2/ERF transcription factors in Arabidopsis. *The Plant cell*, **26**, 1151-1165.
- Wang, P., Gao, J., Wan, C., Zhang, F., Xu, Z., Huang, X., Sun, X. and Deng, X.** (2010) Divinyl chlorophyll(ide) can be converted to monovinyl chlorophyll(ide) by a divinyl reductase in rice. *Plant physiology*, **153**, 994-1003.
- Wasternack, C. and Hause, B.** (2013) Jasmonates: biosynthesis, perception, signal transduction and action in plant stress response, growth and development. An update to the 2007 review in Annals of Botany. *Annals of botany*, **111**, 1021-1058.

- Watanabe, N. and Lam, E.** (2004) Recent advance in the study of caspase-like proteases and Bax inhibitor-1 in plants: their possible roles as regulator of programmed cell death. *Molecular plant pathology*, **5**, 65-70.
- Watanabe, N. and Lam, E.** (2006) Arabidopsis Bax inhibitor-1 functions as an attenuator of biotic and abiotic types of cell death. *The Plant journal : for cell and molecular biology*, **45**, 884-894.
- Watanabe, N. and Lam, E.** (2011) Arabidopsis metacaspase 2d is a positive mediator of cell death induced during biotic and abiotic stresses. *The Plant journal : for cell and molecular biology*, **66**, 969-982.
- Wiermer, M., Feys, B.J. and Parker, J.E.** (2005) Plant immunity: the EDS1 regulatory node. *Current opinion in plant biology*, **8**, 383-389.
- Wildermuth, M.C., Dewdney, J., Wu, G. and Ausubel, F.M.** (2001) Isochorismate synthase is required to synthesize salicylic acid for plant defence. *Nature*, **414**, 562-565.
- Wu, L., Chen, H., Curtis, C. and Fu, Z.Q.** (2014) Go in for the kill: How plants deploy effector-triggered immunity to combat pathogens. *Virulence*, **5**.
- Wu, X., Liu, M., Downie, B., Liang, C., Ji, G., Li, Q.Q. and Hunt, A.G.** (2011) Genome-wide landscape of polyadenylation in Arabidopsis provides evidence for extensive alternative polyadenylation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **108**, 12533-12538.
- Wu, Y., Zhang, D., Chu, J.Y., Boyle, P., Wang, Y., Brindle, I.D., De Luca, V. and Despres, C.** (2012) The Arabidopsis NPR1 protein is a receptor for the plant defense hormone salicylic acid. *Cell reports*, **1**, 639-647.
- Xiao, Y., Wang, J. and Dehesh, K.** (2013) Review of stress specific organelles-to-nucleus metabolic signal molecules in plants. *Plant science : an international journal of experimental plant biology*, **212**, 102-107.
- Xu, G., Paige, J.S. and Jaffrey, S.R.** (2010a) Global analysis of lysine ubiquitination by ubiquitin remnant immunoaffinity profiling. *Nature biotechnology*, **28**, 868-873.
- Xu, J., Yang, C.Y., Yuan, Z., Zhang, D.S., Gondwe, M.Y., Ding, Z.W., Liang, W.Q., Zhang, D.B. and Wilson, Z.A.** (2010b) The ABORTED MICROSPORES Regulatory Network Is Required for Postmeiotic Male Reproductive Development in Arabidopsis thaliana. *The Plant cell*, **22**, 91-107.
- Yamaguchi, N. and Komeda, Y.** (2013) The role of CORYMBOSA1/BIG and auxin in the growth of Arabidopsis pedicel and internode. *Plant science : an international journal of experimental plant biology*, **209**, 64-74.
- Yamaguchi, N., Suzuki, M., Fukaki, H., Morita-Terao, M., Tasaka, M. and Komeda, Y.** (2007) CRM1/BIG-mediated auxin action regulates Arabidopsis inflorescence development. *Plant & cell physiology*, **48**, 1275-1290.
- Yan, J., Zhang, C., Gu, M., Bai, Z., Zhang, W., Qi, T., Cheng, Z., Peng, W., Luo, H., Nan, F., Wang, Z. and Xie, D.** (2009) The Arabidopsis CORONATINE INSENSITIVE1 protein is a jasmonate receptor. *The Plant cell*, **21**, 2220-2236.
- Yang, L., Tang, R., Zhu, J., Liu, H., Mueller-Roeber, B., Xia, H. and Zhang, H.** (2008) Enhancement of stress tolerance in transgenic tobacco plants constitutively expressing AtIpk2beta, an inositol polyphosphate 6-/3-kinase from Arabidopsis thaliana. *Plant molecular biology*, **66**, 329-343.
- Yoshida, K.T., Fujiwara, T. and Naito, S.** (2002) The synergistic effects of sugar and abscisic acid on myo-inositol-1-phosphate synthase expression. *Physiologia plantarum*, **114**, 581-587.
- Zhang, D., Liu, D., Lv, X., Wang, Y., Xun, Z., Liu, Z., Li, F. and Lu, H.** (2014) The Cysteine Protease CEP1, a Key Executor Involved in Tapetal Programmed Cell Death, Regulates Pollen Development in Arabidopsis. *The Plant cell*.



- Zhao, Y., Christensen, S.K., Fankhauser, C., Cashman, J.R., Cohen, J.D., Weigel, D. and Chory, J.** (2001) A role for flavin monooxygenase-like enzymes in auxin biosynthesis. *Science*, **291**, 306-309.
- Zhivotovsky, B. and Orrenius, S.** (2010) Cell death mechanisms: cross-talk and role in disease. *Experimental cell research*, **316**, 1374-1383.
- Zhou, N., Tootle, T.L., Tsui, F., Klessig, D.F. and Glazebrook, J.** (1998) PAD4 functions upstream from salicylic acid to control defense responses in Arabidopsis. *The Plant cell*, **10**, 1021-1030.
- Zimmermann, P., Hirsch-Hoffmann, M., Hennig, L. and Gruissem, W.** (2004) GENEVESTIGATOR. Arabidopsis microarray database and analysis toolbox. *Plant physiology*, **136**, 2621-2632.
- Zipfel, C. and Robatzek, S.** (2010) Pathogen-associated molecular pattern-triggered immunity: veni, vidi...? *Plant physiology*, **154**, 551-554.

# ANNEXES



## Annexe 1. « Supplemental table S1 » de l'article Bruggeman *et al.* (2014).

Numéros d'accèsions des gènes des différents clusters.

### Liste cluster 1.

AT3G30720	AT1G57590	AT2G14520	AT2G39670	AT3G55610	AT3G48420
AT2G32550	AT1G76530	AT4G37220	AT3G52170	AT4G15440	AT2G44050
AT4G19430	AT2G42530	ATCG00590	AT2G42870	AT5G38290	AT4G11130
AT2G24110	AT5G62210	AT4G34250	AT5G24310	AT1G78670	AT3G54090
AT5G38070	AT5G62280	AT2G35120	AT1G72416	AT4G12970	AT3G47650
AT2G20815	AT5G63690	AT2G46250	AT4G20030	AT4G16745	AT1G09795
AT5G14890	AT2G28200	AT5G03800	AT5G59130	AT1G12244	AT1G18730
AT1G78780	AT3G48350	AT5G54145	AT1G25290	AT2G38350	AT1G02280
AT5G07640	AT1G24020	AT3G50560	AT1G73830	AT5G23060	AT4G31870
AT2G42840	AT5G35740	AT3G04290	AT4G19350	AT3G51240	AT3G04260
AT3G03480	AT1G70985	AT3G05937	AT2G23390	AT3G48870	AT4G37330
AT1G01660	AT5G46640	AT5G55570	AT4G27020	AT1G11870	AT4G20070
AT2G29370	AT3G20130	AT3G61060	AT2G43060	AT2G40100	AT2G32180
AT5G13170	AT3G59250	AT5G08610	AT1G76570	AT5G61410	AT3G06730
AT2G41210	AT2G35850	AT2G47630	AT2G03310	AT4G00525	AT5G11270
AT5G01700	AT1G80080	AT1G59700	AT1G76090	ATCG00640	AT1G78630
AT4G30570	AT5G57785	AT4G13640	ATCG00660	AT4G39460	AT5G50420
AT5G19470	AT1G03170	AT4G21323	AT1G30530	AT2G30830	AT3G51820
AT1G18830	AT4G22630	AT4G29020	AT2G32230	AT1G49310	AT1G06980
AT1G62790	AT5G51451	AT4G34970	AT4G10910	AT5G48550	AT3G60370
AT2G40010	AT1G50040	AT5E22750	AT4G18810	AT5G10240	AT4G30950
AT3G08770	AT1G27420	AT4G37320	AT5G09650	AT4G13200	AT3G21110
AT1G53680	AT1G71460	AT5G49990	AT1G62780	AT2G37860	AT3G52380
AT3G02670	AT1G28560	AT3G06520	AT5G60540	AT5E29500	AT5G12150
AT4G13540	AT4G35410	AT4G21870	AT3G26710	AT5G15530	AT3G23760
AT3G17660	AT2G24540	AT4G21620	AT2G45770	AT5G20720	AT1G11850
AT4G29990	AT5G25240	AT3G22840	AT1G15500	AT4G13800	AT1G48520
AT4G32510	AT4G10160	AT5G20450	AT4G26860	AT2G21710	AT1G79560
AT2G41190	AT5G47435	AT1G18650	AT3G24000	AT2G47240	AT4G37760
AT3G21420	AT4G22490	AT2G44460	AT5G60400	AT2G41510	AT5G23750
AT4G25780	AT4G18960	AT1G53250	AT3G25480	AT5G39330	AT2G21385
AT5G20630	AT1G62510	AT5G40160	AT1G16550	AT4G12600	ATCG00040
AT5E27060	AT4G03210	AT1G02205	AT5G51820	AT1G19150	AT4G27640
AT5G45310	AT5G24160	AT2G31890	AT4G10890	AT3G53310	AT5G35220
AT5G66480	AT1G12010	AT1G54120	AT1G64680	AT4G09040	AT4G36530
AT1G64440	AT2G36885	AT3G48390	AT1G11380	AT3G09190	AT3G25660
AT5G04370	AT1G51310	AT3G15560	AT5G60370	AT2G32650	AT4G24140
AT4G22390	AT2G34560	AT5G56220	AT1G05820	AT1G10550	AT1G50450
AT3G01060	AT2G41290	AT1G28010	AT1G58280	AT3G22760	AT3G08740
AT5G09300	AT2G19930	AT5G20380	AT4G28190	AT3G14450	AT2G05990
AT5G44660	AT2G47750	AT5G17710	AT3G59210	AT4G34260	AT3G01480
AT1G34060	AT5G56370	AT2G30200	AT4G25990	AT1G80280	AT5G55280
AT3G26070	AT5G03720	AT1G35310	AT4G33470	AT1G51090	AT2G35760
AT2G03520	AT2G41990	AT1G64690	AT1G03470	AT1G33290	AT3G20270
AT5G36910	AT3G17030	AT5G41050	AT5G48490	AT1G11410	AT2G33800
AT5G12130	AT4G24130	AT1G69200	AT5G63070	AT2G38780	AT1G57770
AT5G17700	AT1G02820	AT1G07050	AT4G23870	AT1G10610	AT1G68540
AT2G47230	AT3G03630	AT5G47110	AT5G45170	AT4G01650	AT2G15090
AT2G22980	AT3G26782	AT1G49880	AT4G12060	AT5G18570	AT4G24620
AT3G10450	AT3G55230	AT3G21300	AT4G01995	AT1G09960	AT1G54740
AT4G16563	AT5G53090	AT4G18370	ATCG00630	AT4G29400	AT3G55800
AT5G01570	AT4G27780	AT1G12230	AT1G73580	AT2G28000	AT3G62910
AT3G28270	AT4G14040	AT5G10320	AT4G31310	AT2G26550	AT1G26770
AT3G59790	AT1G56050	AT3G09160	AT5G15190	AT5G51750	AT5G49910
AT1G27050	AT1G22850	AT4G36850	AT1G10522	AT4G16590	AT2G40490
AT2G17280	AT5G63820	AT1G18060	AT3G57190	AT1G29700	AT1G48600
AT5G08030	AT1G33930	AT2G02750	AT2G34860	AT4G17340	AT4G26670
AT3G56600	AT3G48425	AT3G47030	AT2G22170	AT3G55080	ATCG00070
AT5G47720	AT2G34640	AT5G14280	AT5G11450	AT4G25740	AT1G48350
AT4G38850	AT1G70580	AT5E36280	AT4G25450	AT5G41760	AT2G29650
AT3G53530	AT3G42640	AT5G66720	AT3G27050	AT5G24105	AT3G63190
AT5G24420	AT2G41050	AT1G10830	AT5G19740	AT3G24190	AT5G36170
AT5G13930	AT4G14690	AT5G20670	AT4G19710	AT4G38160	AT5G63310

AT2G21860	AT4G30650	AT1G04820	AT1G21600	AT1G50910	AT1G69550
AT1G14280	AT4G39620	AT1G05140	AT1G22650	AT1G51080	AT1G69700
AT3G27180	AT4G28210	AT1G05190	AT1G22690	AT1G51110	AT1G69830
AT4G29060	AT1G70280	AT1G05310	AT1G22790	AT1G51402	AT1G69890
AT5G51110	AT5G38520	AT1G05385	AT1G22810	AT1G51440	AT1G70370
AT5G17670	AT2G42770	AT1G05835	AT1G23190	AT1G51700	AT1G70410
AT3G24430	AT4G02530	AT1G06080	AT1G23205	AT1G52030	AT1G70470
AT1G64770	AT5G04430	AT1G06190	AT1G23710	AT1G52140	AT1G70740
AT3G47860	AT3G62700	AT1G06750	AT1G23740	AT1G52150	AT1G70770
AT3G61870	AT5G44130	AT1G07070	AT1G23800	AT1G52190	AT1G71050
AT5G07020	AT5G24300	AT1G07320	AT1G23830	AT1G52220	AT1G71500
AT5G13120	AT3G20470	AT1G08520	AT1G24610	AT1G52230	AT1G71930
AT1G71720	AT2G28500	AT1G08540	AT1G25400	AT1G52290	AT1G71990
AT2G05310	AT5G51550	AT1G08550	AT1G26090	AT1G52310	AT1G72230
AT4G36390	AT1G05850	AT1G08970	AT1G26150	AT1G52700	AT1G72520
AT2G36230	AT2G26080	AT1G09070	AT1G26210	AT1G523080	AT1G73090
AT3G05625	AT2G37220	AT1G09410	AT1G26220	AT1G53170	AT1G73110
AT5G46600	AT4G27710	AT1G09750	AT1G26230	AT1G53450	AT1G73320
AT5G62670	AT5G25610	AT1G09890	AT1G26290	AT1G53460	AT1G73540
AT1G75250	AT2G47590	AT1G09950	AT1G26761	AT1G53800	AT1G73590
AT2G02780	AT5G44680	AT1G10180	AT1G26820	AT1G54180	AT1G73600
AT5G17170	AT1G64150	AT1G10560	AT1G26920	AT1G54350	AT1G73655
AT5G65685	AT3G16000	AT1G10960	AT1G26945	AT1G54790	AT1G74070
AT1G55490	AT5G08650	AT1G10970	AT1G27360	AT1G55020	AT1G74160
AT1G80380	AT1G52510	AT1G11190	AT1G27730	AT1G55260	AT1G74470
AT5G17520	AT3G24590	AT1G11545	AT1G27950	AT1G55325	AT1G74670
AT5G14660	AT3G44990	AT1G12110	AT1G28290	AT1G55360	AT1G74930
AT5G28500	AT2G31070	AT1G12220	AT1G28370	AT1G55370	AT1G74970
AT2G40760	AT3G01440	AT1G12520	AT1G28380	AT1G55450	AT1G75230
AT1G12800	AT2G01110	AT1G12750	AT1G29070	AT1G55490	AT1G75460
AT4G34830	AT2G46820	AT1G12800	AT1G29660	AT1G55670	AT1G75500
AT1G70610	AT1G20020	AT1G13280	AT1G29690	AT1G56000	AT1G75690
AT4G17600	AT1G60790	AT1G13930	AT1G29980	AT1G56170	AT1G76100
AT1G35680	AT5G45300	AT1G14030	AT1G30250	AT1G56430	AT1G76160
AT1G11860	AT5G35630	AT1G14150	AT1G30290	AT1G56500	AT1G76240
AT3G25920	AT5G42270	AT1G14210	AT1G30380	AT1G56520	AT1G76560
AT5G62790	AT3G13750	AT1G14345	AT1G30460	AT1G56580	AT1G76600
AT1G32080	AT4G20820	AT1G14480	AT1G30845	AT1G57870	AT1G76610
AT5G10310	AT1G71695	AT1G14910	AT1G31320	AT1G58350	AT1G76800
AT5G23120	AT2G20670	AT1G15260	AT1G31812	AT1G58420	AT1G77110
AT2G35780	AT1G79600	AT1G15390	AT1G31920	AT1G59740	AT1G77420
AT1G66430	AT2G26710	AT1G15410	AT1G32470	AT1G59840	AT1G77490
AT3G18390	AT4G33790	AT1G15690	AT1G32640	AT1G60550	AT1G77690
AT4G14210	AT1G01740	AT1G16080	AT1G32920	AT1G61340	AT1G78070
AT3G48460	AT3G45960	AT1G16410	AT1G32928	AT1G61380	AT1G78080
AT5G05740	AT1G65490	AT1G16590	AT1G32990	AT1G61890	AT1G78090
AT4G26530		AT1G16770	AT1G33040	AT1G62330	AT1G78120
AT5G21100		AT1G16858	AT1G33600	AT1G63490	AT1G78320
AT1G16720		AT1G16920	AT1G33610	AT1G63855	AT1G78450
AT2G40400	<b>Liste</b>	AT1G17030	AT1G33760	AT1G63860	AT1G78480
AT1G58080	<b>cluster 2.</b>	AT1G17190	AT1G33770	AT1G64390	AT1G78690
AT1G12900		AT1G17420	AT1G34430	AT1G64510	AT1G78810
AT1G42970		AT1G17560	AT1G41830	AT1G64625	AT1G78850
AT2G34510	AT1G01080	AT1G17840	AT1G43560	AT1G65010	AT1G78995
AT5G53500	AT1G01110	AT1G17850	AT1G43790	AT1G65270	AT1G79500
AT1G60710	AT1G01190	AT1G17860	AT1G44800	AT1G65370	AT1G79530
AT1G01090	AT1G01430	AT1G18040	AT1G44920	AT1G65960	AT1G79740
AT5G52310	AT1G01610	AT1G18300	AT1G45000	AT1G66100	AT1G79760
AT2G20890	AT1G01970	AT1G18360	AT1G45130	AT1G66350	AT1G79790
AT4G23670	AT1G02150	AT1G19050	AT1G47260	AT1G66820	AT1G79850
AT4G38970	AT1G02335	AT1G19210	AT1G47655	AT1G66910	AT1G79950
AT3G25805	AT1G02350	AT1G19330	AT1G48580	AT1G66940	AT1G80030
AT1G44000	AT1G02690	AT1G19380	AT1G49230	AT1G67630	AT1G80050
AT1G60990	AT1G03160	AT1G19710	AT1G49380	AT1G67860	AT1G80060
AT3G10940	AT1G03600	AT1G19715	AT1G49510	AT1G67865	AT1G80070
AT5G46580	AT1G03630	AT1G19720	AT1G49600	AT1G68060	AT1G80230
AT5G55220	AT1G03820	AT1G19770	AT1G49650	AT1G68238	AT1G80610
AT4G28660	AT1G03870	AT1G19940	AT1G49760	AT1G68330	AT1G80760
AT1G01790	AT1G04000	AT1G20190	AT1G49870	AT1G68400	AT1G80800
AT2G16660	AT1G04250	AT1G20310	AT1G50010	AT1G68560	AT2E05000
AT2G32560	AT1G04260	AT1G20510	AT1G50110	AT1G68725	AT2E05640
AT2G36870	AT1G04430	AT1G20823	AT1G50170	AT1G68810	AT2E07770
AT3G17470	AT1G04510	AT1G20850	AT1G50290	AT1G68840	AT2G01120
AT3G23700	AT1G04680	AT1G21090	AT1G50510	AT1G69080	AT2G01420
AT3G55580	AT1G04770	AT1G21500	AT1G50730	AT1G69490	AT2G01620

AT2G01630	AT2G29890	AT2G43550	AT3G13030	AT3G33002	AT3G57530
AT2G01755	AT2G29980	AT2G43750	AT3G13226	AT3G33004	AT3G57640
AT2G03140	AT2G30390	AT2G44040	AT3G13275	AT3G42630	AT3G57710
AT2G04780	AT2G31290	AT2G44160	AT3G13470	AT3G43720	AT3G57730
AT2G05440	AT2G31440	AT2G44230	AT3G14150	AT3G43810	AT3G57740
AT2G06050	AT2G31560	AT2G44260	AT3G14210	AT3G44260	AT3G57760
AT2G06850	AT2G31725	AT2G44310	AT3G14240	AT3G44730	AT3G57780
AT2G07712	AT2G32390	AT2G44770	AT3G14310	AT3G44890	AT3G59000
AT2G10940	AT2G32400	AT2G44800	AT3G14440	AT3G45010	AT3G59040
AT2G13820	AT2G32440	AT2G44840	AT3G14570	AT3G45160	AT3G59050
AT2G14660	AT2G32510	AT2G45350	AT3G14890	AT3G45430	AT3G59650
AT2G15620	AT2G32930	AT2G45470	AT3G14930	AT3G45610	AT3G59780
AT2G15970	AT2G32990	AT2G45530	AT3G15190	AT3G45640	AT3G59970
AT2G17033	AT2G33180	AT2G45970	AT3G15210	AT3G45680	AT3G60290
AT2G17260	AT2G33255	AT2G46110	AT3G15400	AT3G45850	AT3G60320
AT2G17300	AT2G33370	AT2G46630	AT3G15480	AT3G46530	AT3G60620
AT2G17695	AT2G33450	AT2G47060	AT3G15520	AT3G46600	AT3G60660
AT2G17880	AT2G33540	AT2G47450	AT3G15530	AT3G46620	AT3G60750
AT2G18210	AT2G33580	AT2G47840	AT3G15540	AT3G46670	AT3G61460
AT2G18350	AT2G34300	AT2G48100	AT3G15570	AT3G46780	AT3G61470
AT2G18850	AT2G34600	AT3E12770	AT3G16240	AT3G46970	AT3G61610
AT2G18900	AT2G34680	AT3G01500	AT3G16250	AT3G46980	AT3G61820
AT2G19650	AT2G34930	AT3G01660	AT3G16340	AT3G47570	AT3G62000
AT2G19670	AT2G35130	AT3G01920	AT3G16350	AT3G47960	AT3G62020
AT2G20100	AT2G35410	AT3G02080	AT3G16370	AT3G48040	AT3G62030
AT2G20210	AT2G35880	AT3G02120	AT3G16720	AT3G48330	AT3G62050
AT2G20260	AT2G35930	AT3G02250	AT3G17130	AT3G48720	AT3G62080
AT2G20725	AT2G36090	AT3G02350	AT3G17170	AT3G48730	AT3G62110
AT2G20790	AT2G36250	AT3G02530	AT3G17640	AT3G49160	AT3G62160
AT2G21050	AT2G36485	AT3G03190	AT3G18050	AT3G49220	AT3G62410
AT2G21070	AT2G36490	AT3G03210	AT3G18710	AT3G49530	AT3G62530
AT2G21330	AT2G36570	AT3G03710	AT3G18777	AT3G49670	AT3G63110
AT2G21370	AT2G36830	AT3G04480	AT3G18850	AT3G49680	AT3G63120
AT2G21440	AT2G37400	AT3G04550	AT3G18890	AT3G50060	AT3G63140
AT2G22230	AT2G37430	AT3G04850	AT3G19030	AT3G50685	AT3G63180
AT2G22500	AT2G37460	AT3G05030	AT3G19230	AT3G50790	AT3G63200
AT2G22670	AT2G37470	AT3G05370	AT3G19380	AT3G50800	AT3G63410
AT2G22880	AT2G37880	AT3G05900	AT3G19480	AT3G50870	AT3G63440
AT2G22900	AT2G37900	AT3G05910	AT3G19515	AT3G51220	AT4E07690
AT2G23360	AT2G37925	AT3G06020	AT3G19580	AT3G51480	AT4G00030
AT2G23670	AT2G37940	AT3G06035	AT3G19620	AT3G51510	AT4G00165
AT2G23700	AT2G37950	AT3G06145	AT3G19820	AT3G51600	AT4G00230
AT2G24150	AT2G38010	AT3G06310	AT3G20120	AT3G51830	AT4G00360
AT2G24160	AT2G38080	AT3G06770	AT3G20640	AT3G51950	AT4G00400
AT2G24190	AT2G38090	AT3G06980	AT3G20820	AT3G52070	AT4G00620
AT2G24220	AT2G38120	AT3G07320	AT3G20830	AT3G52150	AT4G00755
AT2G24270	AT2G38140	AT3G07350	AT3G20865	AT3G52450	AT4G01050
AT2G24550	AT2G38320	AT3G07525	AT3G21055	AT3G52520	AT4G01080
AT2G24600	AT2G38790	AT3G07550	AT3G21150	AT3G53100	AT4G01150
AT2G24762	AT2G39010	AT3G07990	AT3G21950	AT3G53370	AT4G01250
AT2G25590	AT2G39330	AT3G08030	AT3G22270	AT3G53410	AT4G01310
AT2G25720	AT2G39650	AT3G08600	AT3G23090	AT3G53800	AT4G01950
AT2G25840	AT2G39700	AT3G08630	AT3G23230	AT3G53900	AT4G02210
AT2G26190	AT2G39800	AT3G08660	AT3G23290	AT3G53980	AT4G02410
AT2G26250	AT2G39850	AT3G08800	AT3G23740	AT3G54000	AT4G02610
AT2G26530	AT2G40000	AT3G08840	AT3G23810	AT3G54050	AT4G02790
AT2G26690	AT2G40130	AT3G08890	AT3G23820	AT3G54210	AT4G03060
AT2G26910	AT2G40150	AT3G08920	AT3G23940	AT3G54260	AT4G03150
AT2G27040	AT2G40300	AT3G09500	AT3G24040	AT3G54470	AT4G03200
AT2G27130	AT2G40610	AT3G09540	AT3G24480	AT3G54830	AT4G03250
AT2G27260	AT2G40750	AT3G09630	AT3G24830	AT3G54890	AT4G03260
AT2G27290	AT2G40860	AT3G09870	AT3G25700	AT3G54910	AT4G03500
AT2G27310	AT2G41120	AT3G10070	AT3G25710	AT3G55260	AT4G04350
AT2G27385	AT2G41130	AT3G10080	AT3G26060	AT3G55330	AT4G04610
AT2G27470	AT2G41310	AT3G10720	AT3G26790	AT3G55360	AT4G04890
AT2G27970	AT2G41680	AT3G10840	AT3G26960	AT3G55370	AT4G05170
AT2G28190	AT2G42220	AT3G10930	AT3G27160	AT3G55440	AT4G08300
AT2G28250	AT2G42320	AT3G11591	AT3G27750	AT3G55980	AT4G08685
AT2G28605	AT2G42610	AT3G11630	AT3G28130	AT3G56060	AT4G08940
AT2G28820	AT2G42690	AT3G11780	AT3G28180	AT3G56090	AT4G09010
AT2G28900	AT2G42900	AT3G12320	AT3G28460	AT3G56330	AT4G09490
AT2G28950	AT2G42975	AT3G12370	AT3G28860	AT3G56620	AT4G09650
AT2G29130	AT2G43030	AT3G12610	AT3G29130	AT3G56810	AT4G10000
AT2G29550	AT2G43360	AT3G12750	AT3G29670	AT3G56880	AT4G10020
AT2G29630	AT2G43530	AT3G13000	AT3G33000	AT3G56910	AT4G10100

AT4G11280	AT4G25290	AT4G38430	AT5G11800	AT5G40150	AT5G58740
AT4G11450	AT4G25434	AT4G38530	AT5G12250	AT5G40382	AT5G58900
AT4G12420	AT4G25630	AT4G38690	AT5G12860	AT5G40450	AT5G59550
AT4G12620	AT4G25660	AT4G38770	AT5G12900	AT5G40910	AT5G59730
AT4G12730	AT4G25890	AT4G38840	AT5G13000	AT5G40950	AT5G59850
AT4G12880	AT4G25970	AT4G38950	AT5G13140	AT5G41400	AT5G59880
AT4G13170	AT4G26100	AT4G39200	AT5G13400	AT5G41460	AT5G60200
AT4G13840	AT4G26370	AT4G39330	AT5G13630	AT5G41870	AT5G60660
AT4G13930	AT4G26520	AT4G39350	AT5G13840	AT5G42070	AT5G60670
AT4G14010	AT4G26760	AT4G39550	AT5G14100	AT5G43460	AT5G60870
AT4G14120	AT4G26790	AT4G39570	AT5G14220	AT5G43950	AT5G61130
AT4G14200	AT4G27180	AT4G39800	AT5G14320	AT5G44020	AT5G61300
AT4G14400	AT4G27280	AT4G39960	AT5G14570	AT5G44030	AT5G61660
AT4G14440	AT4G27300	AT4G39970	AT5G14610	AT5G44070	AT5G62070
AT4G14770	AT4G27560	AT4G40045	AT5G14910	AT5G44400	AT5G62570
AT4G14890	AT4G27595	AT5E02380	AT5G15230	AT5G44520	AT5G62730
AT4G14900	AT4G27657	AT5E22740	AT5G15280	AT5G44582	AT5G62840
AT4G14905	AT4G27730	AT5G01015	AT5G15410	AT5G44650	AT5G62920
AT4G14960	AT4G28070	AT5G01075	AT5G16190	AT5G45275	AT5G63180
AT4G15210	AT4G28250	AT5G01390	AT5G16200	AT5G45330	AT5G63370
AT4G15248	AT4G28360	AT5G01600	AT5G16220	AT5G45340	AT5G63420
AT4G15510	AT4G29080	AT5G01820	AT5G16250	AT5G45680	AT5G63580
AT4G15550	AT4G29240	AT5G01880	AT5G16390	AT5G45930	AT5G63780
AT4G15960	AT4G29590	AT5G01920	AT5G16490	AT5G45950	AT5G64280
AT4G16141	AT4G29780	AT5G02060	AT5G16710	AT5G46190	AT5G64310
AT4G16340	AT4G29920	AT5G02090	AT5G16715	AT5G46290	AT5G64660
AT4G16390	AT4G30110	AT5G02130	AT5G16790	AT5G46510	AT5G64870
AT4G16515	AT4G30410	AT5G02160	AT5G17570	AT5G46700	AT5G64900
AT4G16970	AT4G30440	AT5G02200	AT5G17870	AT5G46830	AT5G66060
AT4G16980	AT4G30580	AT5G02590	AT5G18210	AT5G46910	AT5G66090
AT4G17470	AT4G30993	AT5G02760	AT5G18600	AT5G47190	AT5G66160
AT4G17490	AT4G31050	AT5G02820	AT5G18660	AT5G47230	AT5G66310
AT4G17560	AT4G31550	AT5G02890	AT5G18690	AT5G47800	AT5G66330
AT4G17810	AT4G31720	AT5G02950	AT5G18770	AT5G48460	AT5G66520
AT4G18400	AT4G31820	AT5G03050	AT5G18790	AT5G48485	AT5G66650
AT4G18425	AT4G32020	AT5G03170	AT5G18800	AT5G48880	AT5G66675
AT4G18440	AT4G32060	AT5G03380	AT5G18930	AT5G48900	AT5G66750
AT4G18480	AT4G32840	AT5G03650	AT5G19220	AT5G48920	AT5G67210
AT4G18640	AT4G32880	AT5G03770	AT5G19260	AT5G49020	ATCG00050
AT4G19020	AT4G33090	AT5G04200	AT5G19290	AT5G49030	ATCG00150
AT4G19050	AT4G33260	AT5G04340	AT5G19670	AT5G49215	ATCG00160
AT4G19070	AT4G33510	AT5G04900	AT5G19870	AT5G49630	ATCG00170
AT4G19120	AT4G33666	AT5G05170	AT5G20130	AT5G50370	ATCG00280
AT4G19410	AT4G34060	AT5G05710	AT5G20980	AT5G50740	ATCG00300
AT4G19530	AT4G34090	AT5G05950	AT5G22440	AT5G50890	ATCG00360
AT4G19640	AT4G34140	AT5G05960	AT5G22500	AT5G51190	ATCG00380
AT4G20130	AT4G34160	AT5G06000	AT5G22580	AT5G51390	ATCG00520
AT4G20760	AT4G34220	AT5G06180	AT5G22620	AT5G51540	ATCG00530
AT4G21110	AT4G34290	AT5G06280	AT5G22640	AT5G51720	ATCG00540
AT4G21280	AT4G34410	AT5G06660	AT5G22690	AT5G51890	ATCG00670
AT4G21890	AT4G34550	AT5G06670	AT5G22800	AT5G51990	ATCG00720
AT4G21980	AT4G34730	AT5G06870	AT5G23310	AT5G52930	ATCG00740
AT4G22756	AT4G34740	AT5G07030	AT5G23860	AT5G52960	ATCG00750
AT4G22880	AT4G34760	AT5G07080	AT5G24300	AT5G53490	ATCG00770
AT4G22930	AT4G34980	AT5G07090	AT5G24314	AT5G54180	ATCG00780
AT4G23180	AT4G35100	AT5G07590	AT5G24610	AT5G54470	ATCG00790
AT4G23400	AT4G35350	AT5G07690	AT5G24630	AT5G54490	ATCG00810
AT4G23740	AT4G35940	AT5G07960	AT5G25050	AT5G54855	ATCG00905
AT4G23770	AT4G36250	AT5G08050	AT5G25460	AT5G54880	ATCG01010
AT4G23790	AT4G36360	AT5G08330	AT5G26000	AT5G55380	ATCG01100
AT4G23820	AT4G36500	AT5G08640	AT5G26230	AT5G55480	ATMG01090
AT4G23930	AT4G36540	AT5G09870	AT5G26330	AT5G55910	
AT4G23940	AT4G36550	AT5G10160	AT5G27400	AT5G56850	
AT4G24265	AT4G36650	AT5G10170	AT5G27460	AT5G56940	
AT4G24510	AT4G36670	AT5G10250	AT5G27970	AT5G57030	
AT4G24570	AT4G36945	AT5G10390	AT5G36790	AT5G57130	
AT4G24700	AT4G37100	AT5G10430	AT5G37475	AT5G57390	
AT4G24770	AT4G37290	AT5G10490	AT5G37790	AT5G57780	
AT4G24780	AT4G37610	AT5G10620	AT5G38150	AT5G58090	AT2G13810
AT4G24830	AT4G37630	AT5G10690	AT5G38610	AT5G58140	AT1G15520
AT4G24900	AT4G37750	AT5G10920	AT5G38640	AT5G58250	AT2G45220
AT4G25050	AT4G37800	AT5G11140	AT5G39020	AT5G58260	AT3G13950
AT4G25080	AT4G37970	AT5G11250	AT5G39210	AT5G58320	AT1G65690
AT4G25150	AT4G38170	AT5G11330	AT5G39530	AT5G58390	AT1G74590
AT4G25260	AT4G38370	AT5G11790	AT5G39580	AT5G58550	AT1G68620

Liste  
cluster 3

AT2G45760	AT5G46230	AT1G23840	AT4G14800	AT5G17380	AT5G66620
AT1G44130	AT3G15500	AT5G44390	AT4G14370	AT4G21730	AT5G06750
AT5G19880	AT5G45000	AT5G35735	AT5G20230	AT2G25110	AT3G47810
AT1G03660	AT3G09010	AT3G01290	AT1G34750	AT5G59670	AT4G18890
AT5G02780	AT5G59820	AT1G27100	AT5G38350	AT2G46620	AT2G06530
AT2G43570	AT5G55460	AT5G03630	AT1G17600	AT5G47070	AT3G22845
AT4G39030	AT3G48640	AT2G32680	AT3G51890	AT4G25000	AT3G56710
AT4G11655	AT1G02580	AT2G34850	AT5G01100	AT1G31580	AT4G20860
AT2G38240	AT4G16260	AT4G12720	AT3G17410	AT4G02380	AT1G76650
AT1G69930	AT5G22520	AT5G62770	AT3G29240	AT5G49570	AT3G05830
AT5G48657	AT3G06890	AT1G71100	AT5G10300	AT1G21670	AT2G17220
AT5G13080	AT3G10815	AT4G17500	AT1G48320	AT3G45860	AT1G19180
AT5G39520	AT3G09270	AT5G13200	AT1G23850	AT5G25770	AT2G44080
AT4G04490	AT1G10220	AT4G14365	AT5G37600	AT5G53590	AT1G17290
AT1G57560	AT5G03610	AT1G35710	AT5G03350	AT5G53330	AT2G25510
AT2G34500	AT3G05500	AT2G23680	AT3G44720	AT1G14000	AT1G28200
AT3G13610	AT2G26560	AT3G09440	AT4G02220	AT3G09520	AT4G28460
AT1G21240	AT4G39670	AT4G14610	AT3G46440	AT2G27390	AT5G48380
AT3G18250	AT3G44350	AT1G59590	AT1G51890	AT5G02040	AT3G28450
AT5G26690	AT5G39670	AT3G07195	AT5G45130	AT4G04620	AT1G76150
AT5G09290	AT5G26920	AT2G44380	AT5G51740	AT3G06860	AT3G53780
AT5G46350	AT1G10340	AT4G27860	AT1G20350	AT1G11905	AT2G38580
AT3G57260	AT2G26440	AT4G01360	AT1G21400	AT2G41410	AT1G09970
AT3G26440	AT2G24850	AT1G12420	AT5G61010	AT2G39520	AT1G19270
AT1G17615	AT3G21230	AT1G64170	AT1G53750	AT4G23170	AT2G30440
AT1G52200	AT3G25250	AT4G23470	AT4G37640	AT4G39230	AT1G77890
AT1G33950	AT5G24210	AT3G61280	AT3G57700	AT1G54320	AT1G12360
AT5G57510	AT3G14620	AT5G54610	AT5G51640	AT1G59870	AT1G17380
AT1G73260	AT3G25882	AT5G01540	AT4G09030	AT3G57550	AT3G25600
AT5G11920	AT1G52890	AT3G45620	AT1G64610	AT5G54160	AT4G18930
AT3G09940	AT4G25900	AT5G54140	AT3G50260	AT3G56410	AT3G07390
AT1G57650	AT4G03450	AT3G13330	AT2G44980	AT4G11860	AT3G07680
AT3G21080	AT5G07440	AT5G40760	AT4G39950	AT1G65040	AT1G54140
AT5G22570	AT3G49780	AT1G66880	AT5G15870	AT4G27940	AT2G17705
AT5G67340	AT5G57550	AT5G05730	AT5G48540	AT2G01670	AT5G45510
AT2G18660	AT2G41835	AT1G64065	AT5G42050	AT2G32240	AT5G59890
AT3G54150	AT1G63840	AT2G46430	AT5G35200	AT5G27520	AT3G15518
AT1G65610	AT5G52810	AT1G14880	AT4G28490	AT3G46930	AT3G24500
AT3G45410	AT3G04720	AT4G17670	AT4G14220	AT5G54510	AT1G70530
AT1G74360	AT5G05600	AT3G45040	AT5G27600	AT5G05190	AT1G72700
AT2G41380	AT3G61190	AT1G67800	AT1G50420	AT2G20420	AT3G50930
AT5G26170	AT1G19020	AT1G51620	AT5G27420	AT5G06320	AT3G15356
AT1G19250	AT1G75000	AT3G60260	AT2G37710	AT1G69840	AT1G33420
AT3G61390	AT2G18680	AT5G57910	AT4G16760	AT5G45110	AT4G17900
AT5G42380	AT5G04930	AT5G24810	AT5G61210	AT3G02840	AT3G15430
AT2G47190	AT1G61610	AT5G60900	AT1G07000	AT2G05940	AT5G09330
AT1G03850	AT3G22160	AT2G03510	AT1G32230	AT1G54100	AT4G10040
AT2G43510	AT5G22380	AT2G37970	AT2G31020	AT1G55530	AT3G58600
AT4G38560	AT4G23610	AT1G67850	AT1G30420	AT3G62260	AT5G47220
AT2G44240	AT4G22530	AT1G62850	AT1G75270	AT3G66654	AT1G17610
AT2G47130	AT5G02490	AT3G19970	AT5G61790	AT1G13750	AT2G18330
AT5G53110	AT5G06330	AT2G47950	AT3G19010	AT1G09740	AT1G33560
AT5G45090	AT1G63720	AT5G05460	AT1G14370	AT1G21270	AT2G03120
AT3G01830	AT2G16720	AT1G28480	AT5G03210	AT1G23900	AT2G42010
AT5G17330	AT5G43420	AT5G25930	AT5G23540	AT2G17420	AT3G54100
AT4G01870	AT3G47540	AT5G60800	AT4G29510	AT3G48650	AT1G08830
AT3G51860	AT3G24503	AT3G17609	AT2G20560	AT2G24180	AT1G13210
AT1G13330	AT1G78410	AT1G24140	AT2G46400	AT5G18490	AT4G26970
AT3G08970	AT1G06620	AT5G14930	AT5G16880	AT3G10985	AT4G16500
AT5G64810	AT1G76970	AT5G28237	AT1G30370	AT2G05840	AT3G52930
AT3G28210	AT3G23120	AT1G70690	AT1G11330	AT5G35690	AT1G21380
AT3G51330	AT4G36950	AT1G05710	AT5G47580	AT4G04800	AT2G44350
AT1G01340	AT5G44820	AT3G28340	AT1G30040	AT3G22060	AT1G27000
AT1G21525	AT2G01650	AT3G48090	AT3G28480	AT5G19875	AT3G17810
AT5G60280	AT3G48080	AT3G56320	AT2G28400	AT3G44190	AT5G42440
AT4G18250	AT1G02450	AT2G37110	AT3G55560	AT3G02190	AT1G68440
AT4G25110	AT5G64120	AT5G61900	AT1G12320	AT2G03505	AT1G23440
AT4G23215	AT3G60450	AT3G53110	AT3G11840	AT3G61890	AT5G15490
AT5G57480	AT1G24145	AT4G31800	AT3G02520	AT3G54620	AT3G47420
AT1G79450	AT5G24530	AT4G01010	AT1G66090	AT1G32120	AT1G71040
AT1G33960	AT5G42830	AT4G33050	AT1G15010	AT1G15860	AT2G33120
AT4G26470	AT3G23250	AT2G27690	AT1G72280	AT1G69790	AT3G54810
AT3G21520	AT3G09020	AT1G61640	AT5G01610	AT5G45500	AT3G08590
AT4G14630	AT1G29290	AT1G56150	AT2G28710	AT3G07080	AT4G31850
AT3G26210	AT1G16670	AT3G50470	AT2G46500	AT4G23850	AT1G17340



AT3G06050	AT3G24927	AT3G15810	AT1G21390	AT1G73040	AT2G31945
AT3G27380	AT2G22860	AT2G41090	AT1G21520	AT1G74000	AT2G32340
AT3G50480	AT4G35070	AT4G14430	AT1G21550	AT1G74010	AT2G33740
AT5G07770	AT5G56340	AT3E38660	AT1G21750	AT1G74210	AT2G33830
AT4G02520	AT1G33800	AT5G05780	AT1G22930	AT1G74710	AT2G34050
AT2G31990	AT4G23260	AT2G35658	AT1G23390	AT1G75040	AT2G35980
AT4G23190	AT5G24110	AT5G53830	AT1G23550	AT1G76070	AT2G36080
AT1G59820	AT5G63790	AT4G10810	AT1G24575	AT1G76960	AT2G37060
AT4G25940	AT4G22920	AT5G60300	AT1G26450	AT1G76980	AT2G37680
AT5G22630	AT3G23600	AT3G18690	AT1G26665	AT1G77380	AT2G37750
AT3G56400	AT2G01180	AT3G57450	AT1G27300	AT1G77810	AT2G37760
AT3G03000	AT3G15820	AT5G66250	AT1G27980	AT1G77920	AT2G38340
AT3G04090	AT4G08850	AT2G40140	AT1G28140	AT1G78000	AT2G38860
AT4G04940	AT1G50740	AT3G55320	AT1G28580	AT1G78380	AT2G38870
AT5G05410	AT2G41420	AT3G16470	AT1G29330	AT1G78600	AT2G39310
AT2G30490	AT1G07630	AT3G51180	AT1G29560	AT1G78780	AT2G39360
AT1G73030	AT2G13800	AT5G44500	AT1G29640	AT1G80110	AT2G39530
AT5G43580	AT2G26170	AT1G67970	AT1G30230	AT1G80130	AT2G39570
AT3G28950	AT1G80300	AT1G31940	AT1G30400	AT1G80160	AT2G39710
AT3G10800	AT4G24320	AT1G56660	AT1G30620	AT1G80460	AT2G40340
AT5G04830	AT5G66140	AT4G32285	AT1G30700	AT1G80570	AT2G40520
AT3G11820	AT5G01980	AT3G49390	AT1G31750	AT2G01540	AT2G41070
AT5G66910	AT4G00355	AT3G49060	AT1G31820	AT2G01860	AT2G41150
AT2G32800	AT4G31500	AT1G74100	AT1G32170	AT2G02040	AT2G41220
AT5G47910	AT4G11000	AT1G64370	AT1G32375	AT2G02180	AT2G41250
AT2G42890	AT1G62422		AT1G32950	AT2G02350	AT2G41480
AT3G05200	AT3G07560		AT1G33050	AT2G04400	AT2G41905
AT4G23220	AT5G07360		AT1G33270	AT2G04430	AT2G41940
AT3G63080	AT5G52580		AT1G33330	AT2G04520	AT2G42360
AT3G61860	AT1G22070		AT1G34220	AT2G04630	AT2G42790
AT4G05530	AT2G44100		AT1G43130	AT2G05380	AT2G43590
AT5G58620	AT1G05890		AT1G45145	AT2G05540	AT2G43620
AT2G21520	AT3G08870	AT1G15930	AT1G47510	AT2G14620	AT2G43745
AT3G44100	AT2G28080	AT1G01670	AT1G48300	AT2G15490	AT2G43820
AT3G48140	AT5G45410	AT1G02220	AT1G48405	AT2G16790	AT2G43940
AT5G26680	AT3G60520	AT1G03340	AT1G48850	AT2G17120	AT2G45920
AT1G19300	AT4G37120	AT1G03410	AT1G49000	AT2G17500	AT2G46680
AT1G35720	AT2G20940	AT1G03650	AT1G49300	AT2G17710	AT2G47270
AT2G29400	AT1G42990	AT1G04280	AT1G52315	AT2G17740	AT2G47800
AT1G07870	AT1G68740	AT1G04980	AT1G52590	AT2G18000	AT2G48030
AT2G29720	AT4G08480	AT1G05000	AT1G53510	AT2G18050	AT3G01420
AT5G65750	AT5G26030	AT1G05570	AT1G53790	AT2G18170	AT3G01970
AT5G43060	AT3G09830	AT1G06020	AT1G54490	AT2G18193	AT3G02040
AT5G15650	AT2G13790	AT1G06700	AT1G54575	AT2G18250	AT3G02480
AT3G07870	AT4G25030	AT1G06970	AT1G55320	AT2G18600	AT3G02770
AT3G13520	AT1G63830	AT1G07930	AT1G56145	AT2G19350	AT3G02860
AT4G11670	AT2G39220	AT1G08050	AT1G56460	AT2G20470	AT3G03470
AT5G55600	AT3G53810	AT1G08200	AT1G58030	AT2G21430	AT3G03640
AT3G10300	AT5G18310	AT1G08450	AT1G58340	AT2G21620	AT3G03890
AT4G28300	AT5G66070	AT1G08630	AT1G59520	AT2G21640	AT3G04010
AT3G19640	AT2G36470	AT1G08940	AT1G61250	AT2G22570	AT3G04060
AT4G23460	AT5G11670	AT1G09560	AT1G61370	AT2G24200	AT3G04070
AT3G29170	AT2G23810	AT1G10070	AT1G61810	AT2G24240	AT3G04620
AT4G02570	AT3G52870	AT1G10140	AT1G62540	AT2G24350	AT3G04717
AT3G05090	AT3G21560	AT1G12310	AT1G62710	AT2G25000	AT3G06420
AT5G38210	AT3G56200	AT1G12640	AT1G62810	AT2G25340	AT3G07370
AT1G16370	AT5G13890	AT1G13320	AT1G64090	AT2G25610	AT3G07520
AT5G43900	AT1G32460	AT1G13990	AT1G64360	AT2G25625	AT3G07600
AT4G35750	AT5G46410	AT1G14230	AT1G64660	AT2G26300	AT3G07700
AT5G49930	AT2G17040	AT1G14330	AT1G65720	AT2G27430	AT3G07720
AT1G32790	AT1G01550	AT1G14520	AT1G65820	AT2G28110	AT3G08690
AT4G33300	AT1G20160	AT1G14685	AT1G65980	AT2G28120	AT3G08700
AT5G27020	AT2G04160	AT1G14980	AT1G66580	AT2G28570	AT3G08990
AT1G08920	AT2G40270	AT1G15130	AT1G66670	AT2G28860	AT3G09390
AT4G27740	AT4G28630	AT1G15380	AT1G67360	AT2G29120	AT3G09570
AT4G23130	AT1G17750	AT1G15670	AT1G69280	AT2G29350	AT3G10120
AT4G29440	AT2G46600	AT1G15790	AT1G69450	AT2G29420	AT3G10660
AT5G52210	AT3G52800	AT1G16180	AT1G69526	AT2G29950	AT3G11230
AT5G39450	AT1G35210	AT1G16420	AT1G69730	AT2G30040	AT3G11340
AT1G02390	AT3G48760	AT1G16705	AT1G71140	AT2G30140	AT3G11930
AT4G34150	AT3G02800	AT1G18710	AT1G71950	AT2G30250	AT3G12040
AT3G16990	AT1G03400	AT1G18720	AT1G72060	AT2G31060	AT3G12570
AT1G18210	AT1G18570	AT1G18960	AT1G72680	AT2G31200	AT3G13065
AT4G13110	AT5G38700	AT1G19360	AT1G72790	AT2G31350	AT3G13090
AT2G26600	AT2G23320	AT1G21080	AT1G73010	AT2G31865	AT3G14280

**Liste  
cluster 4**

AT3G14610	AT3G55960	AT4G25835	AT5G24240	AT5G60160
AT3G14990	AT3G55970	AT4G26180	AT5G25250	AT5G60360
AT3G15580	AT3G56170	AT4G26220	AT5G25470	AT5G60610
AT3G16030	AT3G57020	AT4G26270	AT5G26270	AT5G61360
AT3G16150	AT3G57520	AT4G27070	AT5G26340	AT5G61440
AT3G16650	AT3G57680	AT4G27470	AT5G26660	AT5G61490
AT3G16770	AT3G58270	AT4G29160	AT5G26860	AT5G61820
AT3G17000	AT3G58540	AT4G29350	AT5G28830	AT5G62150
AT3G17630	AT3G59220	AT4G29380	AT5G33290	AT5G62200
AT3G17790	AT3G59350	AT4G29470	AT5G37050	AT5G62575
AT3G18830	AT3G59700	AT4G29820	AT5G37580	AT5G62740
AT3G19260	AT3G60140	AT4G30230	AT5G37740	AT5G63030
AT3G19280	AT3G60190	AT4G30270	AT5G38650	AT5G63680
AT3G19520	AT3G60420	AT4G30910	AT5G38890	AT5G63880
AT3G20250	AT3G60640	AT4G32150	AT5G38895	AT5G64230
AT3G21600	AT3G60690	AT4G32870	AT5G38900	AT5G65210
AT3G22370	AT3G61990	AT4G32940	AT5G39040	AT5G66170
AT3G22620	AT3G62590	AT4G33420	AT5G39050	AT5G66630
AT3G22945	AT3G62600	AT4G33540	AT5G39090	AT5G67480
AT3G22990	AT3G62830	AT4G33980	AT5G39190	
AT3G23560	AT3G63010	AT4G34400	AT5G39610	
AT3G23730	AT4G01430	AT4G35110	AT5G39730	
AT3G24170	AT4G01610	AT4G35180	AT5G39995	
AT3G25990	AT4G01850	AT4G36210	AT5G40230	
AT3G26090	AT4G01895	AT4G36470	AT5G40720	
AT3G26470	AT4G02050	AT4G36640	AT5G40730	
AT3G27440	AT4G02610	AT4G37390	AT5G41670	
AT3G28510	AT4G02730	AT4G37520	AT5G42370	
AT3G28540	AT4G02860	AT4G37530	AT5G42900	
AT3G28930	AT4G02980	AT4G38540	AT5G43450	
AT3G29034	AT4G03030	AT4G39080	AT5G43780	
AT3G29035	AT4G08870	AT4G39955	AT5G44460	
AT3G29250	AT4G09750	AT5G01500	AT5G45080	
AT3G29575	AT4G11600	AT5G02100	AT5G45380	
AT3G29810	AT4G11890	AT5G02450	AT5G45840	
AT3G30775	AT4G11910	AT5G03240	AT5G46180	
AT3G43850	AT4G12120	AT5G03460	AT5G46250	
AT3G44300	AT4G12290	AT5G05110	AT5G47120	
AT3G44900	AT4G13180	AT5G05320	AT5G47130	
AT3G45300	AT4G14746	AT5G05340	AT5G47200	
AT3G45310	AT4G15093	AT5G05440	AT5G47590	
AT3G45440	AT4G15470	AT5G06730	AT5G47930	
AT3G45770	AT4G15530	AT5G07380	AT5G48290	
AT3G46230	AT4G15765	AT5G07820	AT5G49510	
AT3G46500	AT4G16190	AT5G08335	AT5G49520	
AT3G47340	AT4G16566	AT5G08380	AT5G49525	
AT3G47480	AT4G16690	AT5G09440	AT5G50200	
AT3G47540	AT4G17030	AT5G10380	AT5G51070	
AT3G48410	AT4G17410	AT5G10760	AT5G51440	
AT3G48740	AT4G17530	AT5G11210	AT5G51630	
AT3G48780	AT4G17720	AT5G12930	AT5G52120	
AT3G48890	AT4G18010	AT5G13180	AT5G53030	
AT3G49055	AT4G18170	AT5G13190	AT5G53120	
AT3G49130	AT4G18830	AT5G13490	AT5G53920	
AT3G49320	AT4G19200	AT5G13800	AT5G54080	
AT3G49380	AT4G19400	AT5G14420	AT5G54100	
AT3G49490	AT4G19515	AT5G14470	AT5G54390	
AT3G50910	AT4G19860	AT5G15500	AT5G54680	
AT3G51000	AT4G19950	AT5G16910	AT5G54870	
AT3G51130	AT4G20110	AT5G17760	AT5G55530	
AT3G51370	AT4G20390	AT5G17890	AT5G55560	
AT3G51660	AT4G20830	AT5G17990	AT5G56180	
AT3G51730	AT4G21320	AT5G18130	AT5G56350	
AT3G52430	AT4G21400	AT5G18270	AT5G56630	
AT3G52905	AT4G21580	AT5G18480	AT5G57900	
AT3G53160	AT4G22240	AT5G18900	AT5G58350	
AT3G53230	AT4G22260	AT5G19440	AT5G58375	
AT3G53630	AT4G23150	AT5G19550	AT5G58540	
AT3G54420	AT4G23600	AT5G19590	AT5G58690	
AT3G54640	AT4G23630	AT5G20250	AT5G58730	
AT3G54680	AT4G23700	AT5G21090	AT5G58782	
AT3G54880	AT4G24040	AT5G23020	AT5G59140	
AT3G54960	AT4G24190	AT5G23240	AT5G59420	
AT3G55610	AT4G24690	AT5G23395	AT5G59950	
AT3G55920	AT4G25280	AT5G23660	AT5G60100	

## Annexe 2. Article 4

### “Chloroplasts-derived signals regulate programmed cell death in the *Arabidopsis mips1* mutant”.

Article en préparation

C. Raynaud *et al.*

#### Introduction

Programmed cell death is a universal process in multicellular organisms, consisting in the controlled and active degradation of the cell. In plants, PCD is required for processes as diverse as development, self-incompatibility, or stress response. One well documented example is the induction of PCD upon pathogen attack, allowing the confinement of the infection, and resistance of the plant. The signalling events leading to the onset of PCD upon pathogen recognition have been extensively studied: pathogen recognition triggers activation of MAP kinases cascades, production of reactive oxygen species (ROS) and salicylic acid (SA), which lead to hyper-sensitive response (1).

On a cellular point of view, several classes of plant PCD have been described and compared to the ones found in animal cells (2). PCD is thought to have evolved independently in plants and animals, and genes underlying these mechanisms are therefore poorly conserved between the two kingdoms. However, most cellular features are conserved between plant and animal PCD which are both characterized by cell shrinkage, chromatin condensation, DNA laddering, mitochondria permeabilization and depolarization (3). In Animal cells, mitochondria play a central role in the regulation of apoptosis: upon perception of pro-death signals, BAX and BAK proteins form oligomers to permeabilize the mitochondrial outer membrane, thereby allowing the release of cytochrome *c*. This results in the activation of caspases (aspartate specific cystein proteases): a family of hydrolases that degrade most cellular macromolecules (4, 5). Although plant genomes do not contain BAX homologues, expression of the murine BAX protein in Tobacco or *Arabidopsis* is sufficient to promote cell death, indicating that this central role of mitochondria is conserved in the plant kingdom (6, 7). This assumption is further supported by the conservation of BAX-inhibitor, a negative regulator of PCD that can prevent cell death induced by ectopic expression of BAX in plants (7), and controls cell death progression during pathogen attacks (8).

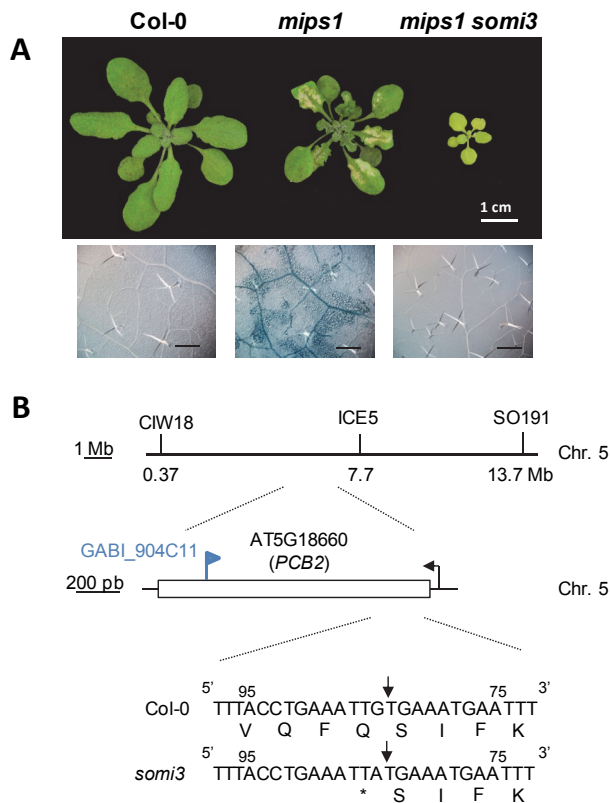
Genetic approaches have greatly contributed to our understanding of cellular pathways governing PCD : isolation of Lesion Mimic Mutants (LMM) in which cell death occurs spontaneously has allowed the identification of several negative regulators of cell death (for review see (9)). Interestingly, lesion formation is light-dependent in several of these mutants, as for example in *lsd1* (10), which is probably

one of the best characterized LMM. Detailed analysis of *lsd1* revealed that the LSD1 protein is required for plant acclimation to excess excitation energy (11) : when plants are exposed to excessive amounts of light, the redox status of the plastoquinone pool in the chloroplastic electron transfer chain influences LSD1-dependent signalling to modulate cell death (12). We have previously identified the *mips1* mutant as a LMM (13). This mutant is deficient for the *myo*-inositol phosphate synthase which catalyses the first committed step of *myo*-inositol (MI) biosynthesis and displays pleiotropic defects such as reduced root growth, abnormal vein development and spontaneous cell death on leaves (13, 14). Interestingly, PCD in the *mips1* mutant is light-dependent as observed for the *lsd1* mutant, suggesting that chloroplasts may play a role in the MI dependent cell death regulation. Indeed in recent years, accumulating evidence that chloroplasts may play a central role in PCD regulation like mitochondria in animal cells (15). Firstly, as described in the case of *lsd1*, the redox status of the plastoquinone pool can function as a trigger for PCD. Furthermore, singlet oxygen, a reactive oxygen species (ROS) can activate the EXECUTER1 and 2 proteins in the chloroplasts, resulting in PCD activation (16). Likewise, ROS generated by chloroplasts play a major role for PCD onset during non-host interaction between Tobacco and *Xanthomonas campestris* (17). Finally, functional chloroplasts have also been shown to be required for PCD in cell suspensions (18), and mutations affecting chlorophyll accumulation can suppress the cell death phenotype of *lsd1*, *mips1* or *len1* (11, 13, 19).

In a screen for extragenic secondary mutations that abolish the *mips1* cell death phenotype (Bruggeman et al, in prep), we identified the *somi3* (*suppressor of mips1 3*). This mutant is pale green and obviously deficient for chlorophyll accumulation. Here we show that *somi3* is deficient for the divinyl protochlorophyllide 8-vinyl reductase which is involved in chlorophyll biosynthesis. This finding prompted us to further investigate how chloroplasts contribute to the regulation of cell death in the *mips1* mutant. We found that the severity of lesion formation was correlated with photosynthetic activity, pointing to a mechanism involving a metabolism-dependent retrograde signalling pathway from the chloroplast to the nucleus.

## Results

### A mutation affecting chlorophyll biosynthesis suppresses lesion formation in *mips1*.



**Figure 1: The *somi3* suppressor harbours a mutation in the *PCB2* gene**

**A:** Suppression of the cell death phenotype in the *mips1 somi3* mutant. Plants were grown under SD for 2 weeks and transferred to LD for 4 days to induce lesion formation. Bottom panels corresponds to trypan blue staining. scale : 500µm

**B:** Position of the *somi3/pcb2-2* mutation in the *PCB2* gene. The blue flag represents the position of the T-DNA in the *pcb2-3* allele.

In a genetic screen designed to identify suppressors of the *mips1* cell death phenotype, we isolated a mutant severely affected for pigment accumulation: *somi3* (Figure 1A). To identify the gene that was mutated in *somi3*, we generated a F2 population from a cross between the suppressor mutant and the *mips1-2* mutant that is in the Ws background. Rough mapping of the mutation by Bulk-Segregants Analysis allowed us to position it at the top of chromosome 5 between markers *ciw18* and *ICE5* (Figure 1B). Genomic DNA was extracted from 100 plants displaying the suppressor phenotype and was used for SHORE-map analysis (20). We found a single SNP in the *PCB2* (*PALE GREEN AND CHLOROPHYLL B REDUCED 2*,

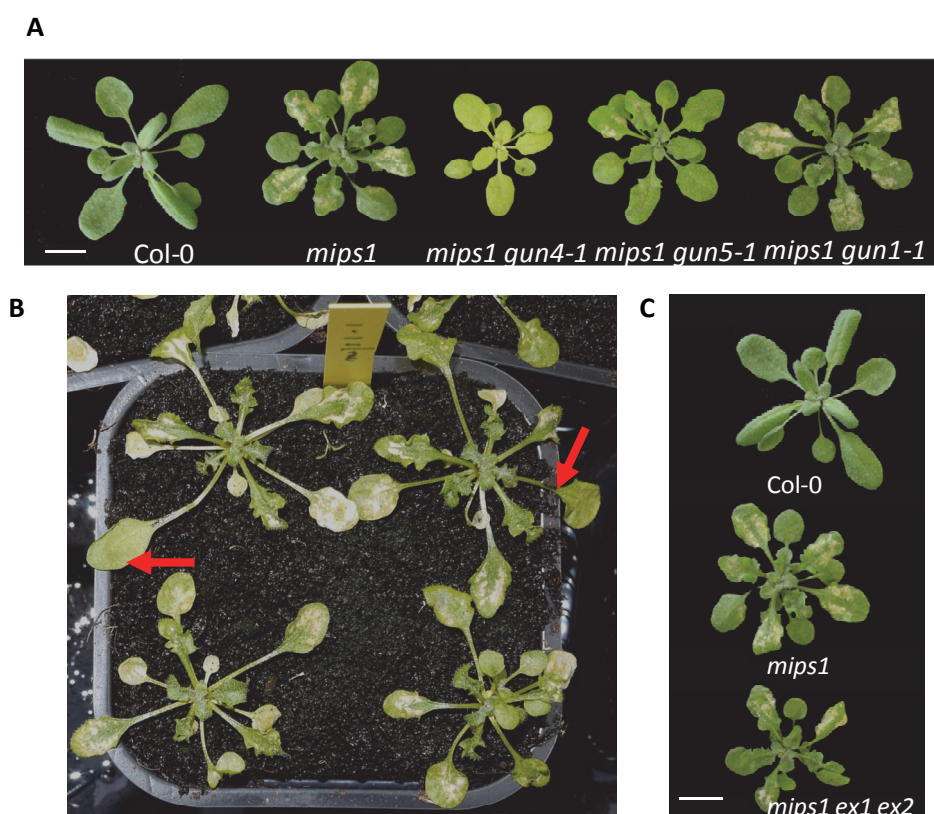
AT5G18660) gene (21). *PCB2* likely encodes a divinyl protochlorophyllide 8-vinyl reductase which catalyzes the conversion of divinyl protochlorophyllide a to monovinyl protochlorophyllide a (21). Loss of *PCB2* activity results in drastically reduced pigment accumulation, with a particularly pronounced decrease in chlorophyll b amounts in leaves (21). To confirm that *somi3* mutants were indeed deficient for the *PCB2* gene, we ordered the GABI\_904C11 line harbouring an insertion in *PCB2* (*pcb2-3* mutants). Mutants homozygous for this insertion are albino (data not shown), but hemizygous plants are identical to the wild-type. As expected, half of the plants in the F1 generation of a cross between *somi3* and *pcb2-3/+* mutants were pale green (Figure S1). The mutation identified in our genetic screen will be hereafter referred to as *pcb2-2*.

Finally, *mips1-1 pcb2-2* mutants were transformed with a construct encompassing the wild-type *PCB2* cDNA downstream of a 35S promoter. As shown on Figure 1C, introduction of the *PCB2* cDNA

allowed restoration of pigment accumulation, and restored lesion formation due to the *mips1-1* mutation, confirming that suppression of the *mips1* phenotype was due to the *pcb2-2* mutation.

### Functional chloroplasts are required for the onset of PCD in *mips1*

We have previously reported that the *mips1* phenotype was suppressed by inactivation of the *GUN4* gene via an artificial micro-RNA (13). The reduction of cell death associated with *GUN4* silencing and



**Figure 2: PCD in *mips1* requires functional chloroplasts and exposure to light but is not mediated by singlet oxygen production**

A: The cell death phenotype of *mips1* is suppressed by the *gun4* and *gun5* mutations that alter chlorophyll accumulation, but not by the *gun1* mutation.

B: PCD in *mips1* requires exposure to long days. On plants grown under LD, leaves maintained under a SD regime do not form lesions (red arrows).

C: Lesion formation does not depend on singlet oxygen signalling: *mips1 ex1 ex2* triple mutant form lesions under LD like the *mips1* mutant. Bars = 1cm

converts Mg-Proto IX into Mg protoporphyrin IX methylester) does not result in a *gun* phenotype (23) as defined by (24). One alternative hypothesis would be that functional chloroplasts are required for the onset of cell death in the *mips1* mutant. To discriminate between these two hypotheses, the *mips1* mutant was crossed with the *gun1*, *gun4* and *gun5* mutants available in the Col-0 background (24). As shown on Figure 2A the *gun1* mutation which affects retrograde signalling but not chlorophyll biosynthesis (25) had no effect on the *mips1* phenotype. By contrast, the *gun5-1* mutation which corresponds to a weak-allele (26) had a mild effect on the *mips1* phenotype, whereas the *gun4-1* mutation completely abolished the cell

*pcb2-2* mutation may reflect a role for a retrograde signalling pathway involving tetrapyrroles intermediates in the control of cell death. The nature of the signalling molecule involved in the GUN pathway remains highly debated (22), but down-regulation of *GUN4* and *PCB2* would be expected to have different outcomes on the accumulation of the two most likely candidates (heme and Mg-Proto IX) since GUN4 acts upstream of these compounds whereas PCB2 is downstream of Mg-ProtoIX. Indeed, loss of CHLM (the enzyme that

death phenotype one week after transfer to LD conditions although. Hence, we observed a correlation between the intensity of lesions and chlorophyll accumulation.

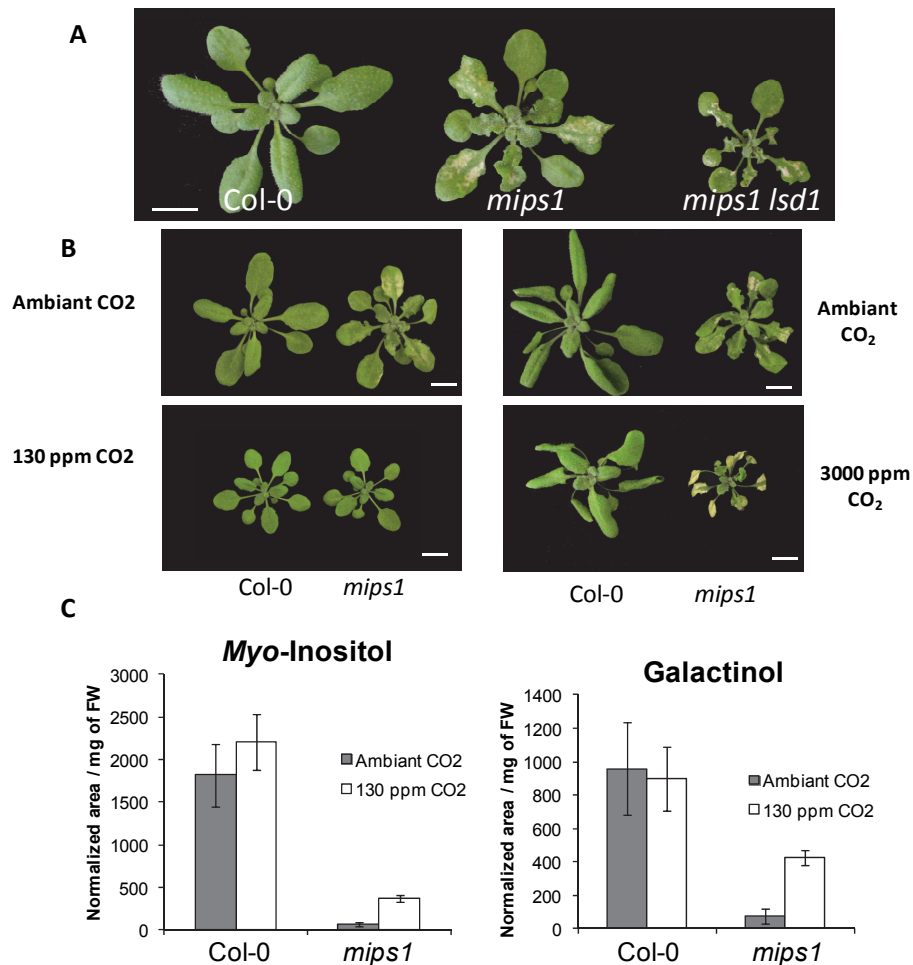
### **Light-induced PCD in *mips1* is controlled by light locally.**

The observation that functional chloroplasts are required for PCD in *mips1* led us to postulate that cell death could be regulated locally by light in this mutant. To test this hypothesis, several *mips1* mutant plants were transferred to LD conditions to induce PCD, but on each plant, one leaf was kept under SD conditions by protecting it with aluminum foil. As shown on Figure 2B, shaded leaves did not display lesion formation, confirming that local light exposure is required for PCD to occur. Taken together, our results suggest that light-dependent signals produced by chloroplasts are responsible for the PCD observed in *mips1* and that although *mips1* mutants have been shown to over-accumulate salicylic acid (SA)(13) that can function as a systemic signal, this effect of light occurs in a leaf-autonomous fashion. One well established chloroplast-dependent pathway controlling PCD is mediated by the EXECUTER proteins. EX1 and EX2 proteins have been shown to govern plant response to singlet oxygen and to induced PCD in the *flu* (fluorescent) mutant that conditionally produces high amounts of  $O_2^1$  (16). We therefore generated *mips1lex1lex2* triple mutants to determine whether PCD was reduced in this context. Surprisingly, the *mips1lex1lex2* triple mutant was identical to *mips1* (Figure 2C), indicating that singlet oxygen production is not the trigger for PCD onset in *mips1*.

### **Redox changes associated with chloroplast activity are not responsible for the *mips1* phenotype**

PCD can also be triggered by changes in the redox status of the plastoquinone pool when plants receive excess amounts of light, and the LSD1 protein has been shown to be required for confinement of cell death under these conditions (11): *lsd1* mutants show light dependent lesion formation like the *mips1* mutant. To genetically test whether MIPS1 could function in the same pathway, we generated *mips1lsd1* double mutants. *Mips1lsd1* mutants were more severely affected than the two parents: lesions appeared earlier, and plant growth was more severely inhibited (Fig3A, FigS2): this additivity of the phenotypes suggests the two proteins function in two independent pathways. Singlet oxygen production and reduction of plastoquinones are not the only redox changes associated with chloroplast activity in the light. For example, photorespiration, a metabolic pathway involving the cooperation of chloroplasts, mitochondria and peroxisomes also produces hydrogen peroxide in peroxisomes. We have recently shown that ROS, and particularly  $H_2O_2$  production does not seem to be increased in *mips1* prior to lesion formation (27), but *mips1* could show increased sensitivity towards ROS production. We therefore grew the *mips1* mutant under high  $CO_2$  to lower photorespiration and thereby  $H_2O_2$  production in peroxisomes (28). Surprisingly,





**Figure 3: Lesion formation depends on chloroplast metabolic activity rather than redox status**

A: The phenotype of the *mips1* mutant is enhanced in the *lsd1* background. Bar = 1cm.

B: The severity of the *mips1* phenotype is enhanced by CO<sub>2</sub>. Wild-type (Col-0) and *mips1* mutant were grown under ambient CO<sub>2</sub> and short day conditions for 15 days, and then transferred to long day conditions under ambient, low (130 ppm) or high (3000ppm) CO<sub>2</sub>. Bars=1 cm.

C: Growth under low CO<sub>2</sub> partially restores *myo*-inositol and galactinol accumulation in *mips1*.

this increased the cell death phenotype (Figure 3B). Consistently, cell death was rescued when *mips1* mutants were grown under low CO<sub>2</sub> (Figure 3B). These observations suggest that redox changes associated with chloroplast function are not the trigger for PCD in *mips1*.

Cell death occurrence in *mips1* highly depends on the developmental stage of the plant at the time of transfer to LD conditions, and Donahue et al have shown that MI levels return to normal in 60-day-old plants (14). To determine whether growth under low CO<sub>2</sub> may affect MI

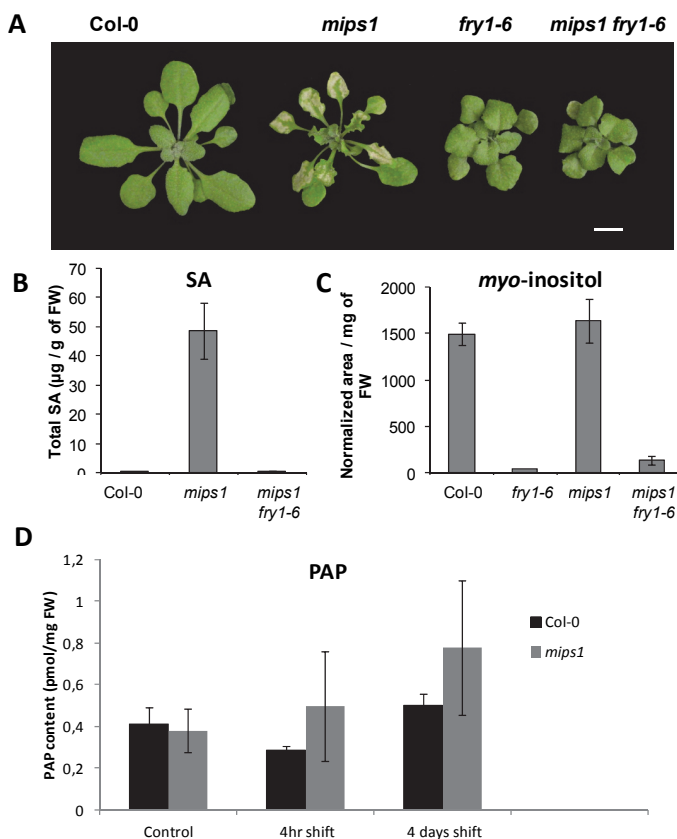
accumulation in *mips1*, or if accumulation of other metabolites could be modified in these conditions, we performed metabolomic profiling. We found that MI accumulation was 17% of wild-type levels under low CO<sub>2</sub> whereas it was below 4% of wild-type levels under ambient CO<sub>2</sub>. In addition, we found that accumulation of MI derivate galactinol was increased in *mips1* under low CO<sub>2</sub>. Although we cannot rule out the possibility that this mild increase in MI accumulation is sufficient to avoid lesion formation, MI accumulation remained very low in *mips1* under low CO<sub>2</sub>, suggesting that suppression of the cell death phenotype could be due to a different mechanism.



### PCD in *mips1* is suppressed by PAP-signaling

Together, our results suggest that chloroplast metabolism rather than redox state is responsible for the cell death phenotype of *mips1* mutants. One chloroplast metabolite known to function in retrograde signalling in the light is 5'-phosphoadenosine-3'-phosphate (PAP): this molecule is accumulated in chloroplasts under high light and drought stress, and is thought to inhibit the activity of exo-ribonucleases to prevent the degradation of mRNAs and promote stress response (29). The *sal1/fry1/axl8* mutant lacks the enzyme that dephosphorylates PAP in adenosine monophosphate (AMP), resulting in constitutively high levels of PAP (29). We crossed the *fry1-6* mutant (30) with the *mips1* mutant to test the role of PAP signalling in the control of PCD. As shown on Figure 4A, lesion formation was completely abolished in the double mutant. This suppression of the *mips1* phenotype correlated with the suppression of SA accumulation characteristic of the *mips1* phenotype (13) (Figure 4B). Because the *mips1* mutant shows pleiotropic defects, we also tested whether the *fry1-6* mutation could restore normal root growth and

cotyledon development in *mips1*. As shown on Figure S3A, cotyledon development was affected in a similar way in *mips1* and *mips1 fry1-6*. Root growth was reduced in *mips1* and *fry1-6* mutants, and even more so in *mips1 fry1-6*, indicating that the two mutations have additive effects (Figure S3B). In agreement with these observations MI accumulation was not restored in the *mips1 fry1-6* mutant, indicating that the *fry1-6* mutation acts in signalling events occurring downstream of MI depletion. One simple hypothesis would be that transfer to LD conditions induces increased PAP production in the wild-type to face the new light conditions, and that *mips1* mutants are deficient for this regulation. However, PAP quantification did not reveal any changes in PAP accumulation in *mips1* compared to the wild-type (Figure 4C).



**Figure 4: Lesion formation is suppressed by the *fry1-6* mutation.**

A: The phenotype of the *mips1* mutant is rescued by the *fry1-6* mutation. Wild-type (Col-0), *mips1*, *fry1-6* and *mips1 fry1-6* double mutants were grown under SD for 15 days and transferred to long days for 5 days. Bar = 1cm

B: Salicylic acid accumulation upon transfer to LD conditions is suppressed in the *mips1 fry1-6* mutant. Salicylic acid accumulation was measured 4 days after transfer to LD conditions.

C: MI accumulation is not restored in the *mips1 sal1* double mutant.

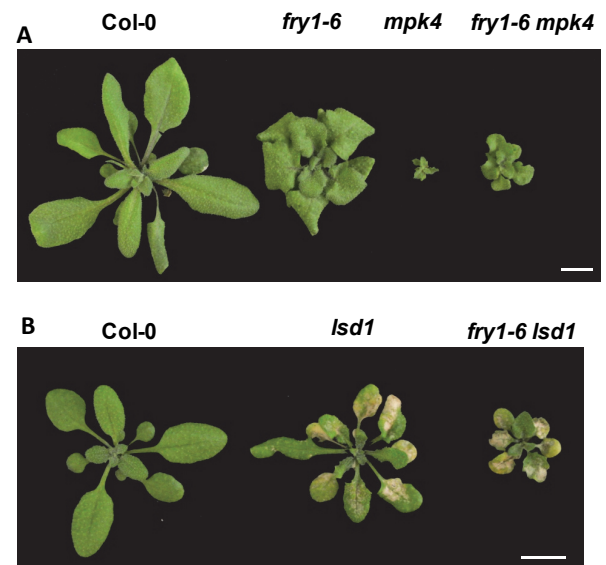
D: PAP content in wild type (Col-0) and *mips1* mutants 4h and 4 days after transfer to LD conditions.

We next asked whether the *fry1-6* mutation is a general suppressor of PCD or whether this effect is specific to the MIPS1 pathway. To this end, we crossed the *fry1-6* mutant with *lsd1*, which promotes PCD independently of *mips1* and with *mpk4*, which shows constitutive activation of defence response (ref), and has been reported to regulate *MIPS1* expression (31). The *fry1-6* mutation partially restored the phenotype of the *mpk4* mutant, but did not prevent cell death in the *lsd1* background, demonstrating that the suppression of the *mips1* phenotype is not due to aspecific enhancement of stress tolerance in the *fry1-6* mutant.

MPK4 is a well-known regulator of plant immunity (32), and appears to regulate *MIPS1* expression in response to the bacterial peptide flagellin (31). We therefore asked if resistance to pathogens was affected by the *fry1-6* mutation. Wild-type and *fry1-6* mutants were infiltrated with the virulent strain of *Pseudomonas syringae* pv *tomato* DC3000 and bacterial growth was followed for 2 days. As shown on Figure 6, the *fry1-6* mutant displayed high susceptibility towards this pathogen, indicating that PAP over-accumulation, although it improves plant tolerance to abiotic stress has a negative impact not only on cell death but also on defence mechanisms.

Finally, to gain insight into the mechanisms

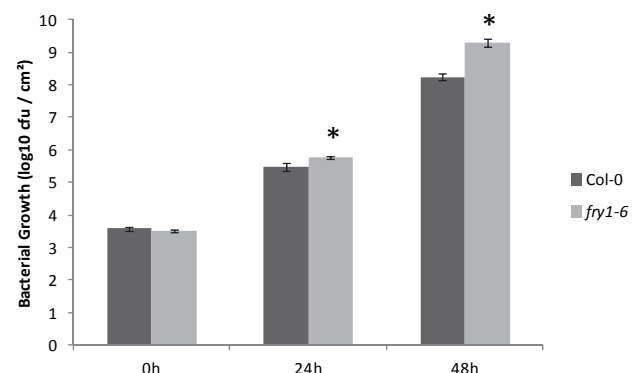
allowing cell death suppression in the *mips1 fry1-6* mutant, we tested the contribution of the inhibition of XRN activity by PAP over-accumulation. To this end, the *mips1* mutant was crossed with the *xrn2-2 xrn3-3 xrn4-1* mutant and quadruple mutants were isolated. As shown on Figure 7, mutation of *XRN2-4* suppressed lesion formation in *mips1*, providing evidence for the role of post-transcriptional regulatory



**Figure 5: The *fry1-6* mutation is not a general suppressor of plant PCD.**

A: The phenotype of the *mpk4* mutant is partially rescued by the *fry1-6* mutation.

B: The phenotype of the *lsd1* mutant is not modified in the *fry1-6* background. Bars = 1 cm



**Figure 6: The *fry1-6* mutation compromises basal immunity.**

Twenty-eight-day-old Col-0 and *fry1-6* plants were infiltrated with a suspension of *P. syringae* pv *tomato* DC3000., and bacterial growth was followed for 2 days. The number of colony forming units (cfu) was already significantly higher in *fry1-6* than in the wild-type (Col-0) 24h after inoculation, and this difference became more obvious after 48h. Asterisks indicate significantly different values (Wilcoxon signed-rank test, p value < 0.01)

mechanisms in the control of cell death and opening new research prospects regarding the relationships between retrograde signalling and RNA metabolism.



**Figure 7: Suppression of cell death in *mips1 fry1-6* can be reproduced in exoribonuclease-deficient mutants.**

The *mips1* mutant was crossed with the *xnr2-2 xrn3-3 xrn4-1* triple mutants, and quadruple mutants were selected from the F3 generation. Lesion formation in the quadruple mutant was drastically reduced while plant growth was restored.

## Discussion

Because they are the site of light energy capture and a hub for metabolic pathways, chloroplasts are ideally suited to perceive changes in environmental conditions. Indeed there is accumulating evidence that these organelles play a critical role in plant response to various types of stress (33) and in the control of PCD (34). The molecular basis for this contribution is not fully elucidated, and probably involves several distinct signalling pathways, but ROS are excellent candidates because chloroplasts are one of the major ROS sources in plant cells (35) and because

ROS production is one of the early consequences of excess light capture by the photosynthetic apparatus.

Here we have investigated how chloroplasts contribute to the cell death phenotype of the *mips1* mutant, and we show that the photosynthetic capacity of the plant appears to be required for cell death to occur in the absence of MI. Similar observations have been reported in a number of LMM, but the underlying mechanisms may vary from one mutant to another. In the case of the *lsd1* mutant, it has been established that cell death occurs in response to changes in the redox status of plastoquinones, which account for suppression of the phenotype in mutants with reduced chlorophyll accumulation (11, 12); whereas in the *len1* mutant, cell death could be due to excess accumulation of chlorophyll catabolism products (19). Although the observation that reduced chlorophyll accumulation in *mips1* prevents lesion formation provides evidence for a role of chloroplasts in this process, the underlying mechanisms are probably different from those described in *lsd1* and *len1*. Indeed, PCD is triggered by long days in *mips1*, which rules out the possibility that accumulation of toxic chlorophyll degradation products in the dark could be the cause for lesion formation. Furthermore, our genetic analysis revealed that LSD1 and MIPS1 function in different pathways, indicating that changes in the PQ redox pool are not the initial event leading to cell death in *mips1*. This is corroborated by the observation that the *mips1* phenotype is more severe when plants are grown under high CO<sub>2</sub> whereas these growth conditions suppress cell death in *lsd1* (11). Another signalling pathway linking chloroplasts to the regulation of plant PCD is mediated by

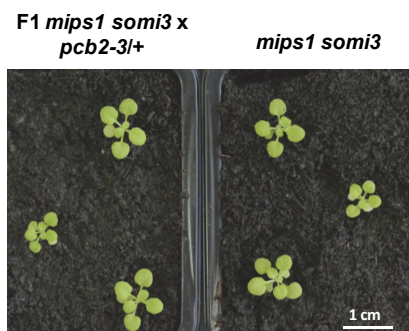
EXECUTER proteins that govern chloroplast leakage leading to cell death in response to singlet oxygen production (16, 34). As observed for the *mips1* mutant in which shaded leaf do not form lesions, this signalling cascade has been shown to function locally or probably cell-autonomously since cell death in the *variegated 2* background that induces the formation of white sectors on leaves is confined to leaf cells with normal chloroplasts (34). However, our analysis demonstrates that the EXECUTER pathway is not involved in *mips1*, illustrating that several apparently independent retrograde signals from chloroplast to the nucleus exist in plant cells.

Unexpectedly, we found that the *mips1* phenotype does not correlate with photorespiration but on the contrary is reverted under low CO<sub>2</sub> and enhanced under high CO<sub>2</sub>. This observation points towards a metabolic effect. Although we cannot rule out the possibility that the mild restoration of MI accumulation under low CO<sub>2</sub> is sufficient to avoid cell death, MI levels remained very low under this condition. Furthermore, the observed increase in galactinol accumulation is also unlikely to account for the suppression of lesion formation. Indeed, galactinol application is sufficient to prevent lesion formation in *mips1* (Meng et al, 2009). However, mutants lacking Galactinol Synthase 1 activity, although they fail to accumulate galactinol in response to heat stress do not show spontaneous cell death (36), indicating that the suppression of the *mips1* phenotype was probably due to MI biosynthesis from absorbed galactinol, possibly via raffinose biosynthesis. Hence our results suggest that chloroplast metabolites are involved in cell death onset in *mips1*. Several molecules originating both from primary and secondary metabolism have been shown to act as retrograde signalling elements. For example, Vogel et al have recently shown that transport of triose-phosphates to the cytoplasm is likely instrumental to the activation of a signalling cascade involving the MAP Kinase 6 leading to changes in nuclear gene expression when plants are transferred from low to high light conditions (37). A wealth of plastid-derived metabolites have been shown to modulate plant response to abiotic stress (33). Among those, PAP plays a role in plant tolerance to high light and drought (29). Interestingly, PAP over-accumulation due to the *fry1-6* mutation completely abolished lesion formation in *mips1*, and this effect was specific to the *mips1* and *mpk4* mutants that have previously been shown to participate to the same pathway (31) whereas the *lsd1* mutation still caused cell death in the *fry1-6* background. This finding indicates that PAP over-accumulation does not antagonize all types of cell death or SA production, but rather opposes early steps of LD response in *mips1*. However, we could not detect any changes in PAP accumulation in *mips1* compared to Col0, indicating that SAL1 does not function directly downstream of MI accumulation to modulate cell death but rather acts on mechanisms misregulated in *mips1* via an independent pathway.

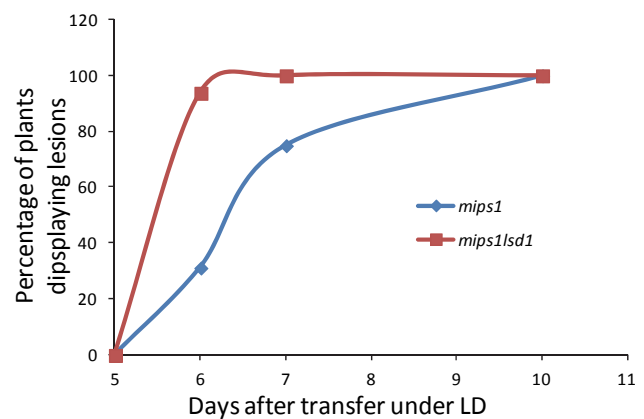
Accumulation of a number of metabolites and phytohormones is altered by PAP, including MI, putrescine and jasmonic acid. However, we did not detect clear restoration of MI accumulation in *mips1* *fry1-6*, nor did we detect increase in MI accumulation in the *fry1-6* allele used in this study. SA and JA

signalling are generally regarded as antagonistic pathways for a number of physiological responses (38). In agreement with this assumption, we reported that the *aos* mutation that impairs JA production aggravates lesion formation in *mips1* (13), suggesting that the suppression of the *mips1* phenotype could be due to JA over-accumulation in *fryI-6*. However, if this were the case, the *fryI-6* mutation would be expected to rescue other mutants displaying SA-dependent cell death such as *lsd1*, which was not the case. Conversely, JA over-accumulation in *fryI-6* is unlikely to account for the increased susceptibility to pathogens since mutants over-accumulating JA have been reported to show enhanced resistance to several pathogens including *P. syringae* (39).

Since mutations in *xrn2*, 3 and 4 (to be confirmed?) also suppressed lesion formation in *mips1*, it is tempting to speculate that post-transcriptional regulations targeting defence response genes are involved in PCD onset in *mips1*. Consistently, we recently reported that the CPSF30 sub-unit of the polyadenylation complex was required for lesion formation in *mips1* (27). However, we showed that CPSF30 is required for cell death in all tested LMM, suggesting that CPSF30 acts on much more general pathways than PAP. Interestingly, retrograde signals have recently been shown to modulate alternative splicing (40), raising the possibility that changes in RNA maturation induced by growth conditions are responsible for lesion formation in *mips1*. Together, this work and others shed light on the contribution of post-transcriptional regulatory mechanisms to the control of plant PCD, and immunity.

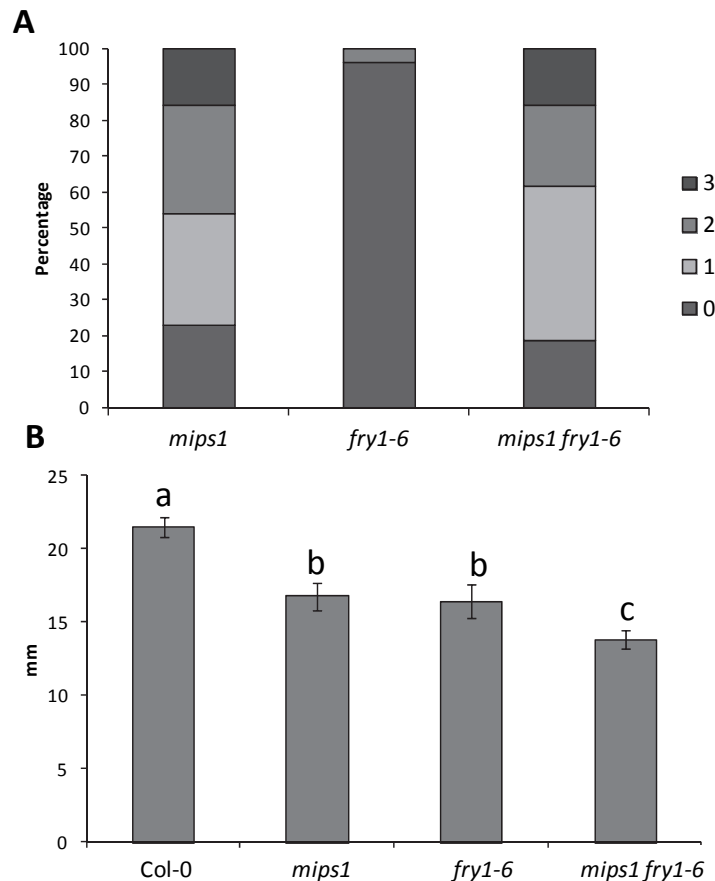


**Figure S1: The *somi3* mutation is allelic to *pcb2-3***  
*Somi3 mips1* mutants were crossed to hemizygous *pcb2-3/+* mutants. In the F1 generation, half of the plants were identical to *somi3*, confirming that the *somi3* and *pcb2-3* mutations are allelic.



**Figure S2: Lesion formation occurs earlier in the *mips1 lsd1* mutant than in *mips1*.**

Plants were grown under SD for 2 weeks and then transferred under LD. Lesion formation was followed after transfer to LD.



**Figure S3: *mips1* developmental defects are not suppressed by the *fry1-6* mutation.**

A: Defects in cotyledon development in *mips1*, *fry1-6* and *mips1 fry1-6* mutants were scored on 10 day old in vitro grown plantlets as described in Bruggeman et al (2014); class 0 correspond to normal cotyledons and class 3 to the most severely deformed.

B: Root length of 14 day-old plants of the indicated genotype. Values are average  $\pm$  standard deviation obtained on at least 20 samples. Different letters indicate significantly different values (Student t-test  $p < 0.01$ ). In A and B data are representative of two independent experiments.

## Experimental procedures

### Plant material and growth conditions

Seeds were surface-sterilized by treatment with bayrochlore for 20 min and washed and imbibed in sterile-water for 2–4 days at 4 °C to obtain homogeneous germination. Seeds were sown on commercially available 0.5x Murashige and Skoog (MS) medium (Basal Salt Mixure M0221, Duchefa) supplemented or not with sucrose (1% w/v) solidified with 0.8% agar (Phyto-Agar HP696, Kalys) and grown in a long-day (16h light, 8h night, 21°C) growth chamber. After 2 weeks, the plants were transferred to soil in a glasshouse or in a growth chamber under short-day conditions (8 h light 20°C, 16h night at 18°C) for 2 weeks before being transferred to long-day conditions. Seeds of the *ex1* (SALK\_026475), *ex2* (SALK\_112295), *fry1-6* (SALK\_020882) (41) and *pcb2-3* (GABI\_904C11) (42) mutants from obtained from the Nottingham Arabidopsis Stock Centre. Seeds of the *gun4-1*

and *gun5-1* mutants were a gift from S. Noir. For genotyping, plant genomic DNA was extracted according to (43). Primers used for PCR analysis are listed in Table S1.

### **Bulk segregant analysis and SHORE-map**

#### Mapping of the *somi3* mutation

To map the *somi3* mutation, *mips1-1 somi3* plants in the Col-0 background, were crossed with the *mips1-2* mutant in the WS background. First, a Bulk Segregant Analysis (BSA) was performed using F2 plants without (n=22) or with lesions (n=22) in LD. Primer sequences that flank polymorphism markers between Col-0 and WS are described by (44). Second, fine mapping of the *somi3* mutation was performed by a high throughput sequencing of nuclear DNA obtained from a bulk of 156 F2 plants without lesions in LD. Whole Arabidopsis genome re-sequencing were performed by the company Macrogen (10F, 254 Beotkkot-ro Geumcheon-gu, Seoul, Rep. of Korea) using the Illumina HiSeq2000® technology. The software CLC genomic workbench® (www.clcbio.com) were used to analyze sequence and identify single-nucleotide polymorphism (SNP) by comparison with Col-0 genome as reference (TAIR10).

### **Cloning methods**

The coding sequence of *PCB2* (At5g18660) was amplified from Col0 genomic DNA using primers listed in Table S1. The PCB2 coding sequence was cloned into the Gateway compatible pEntr3C vector (Invitrogen) and transferred into the binary vector pB7FWC;2 using the LR clonase (Invitrogen) according to manufacturer's instructions. In this plasmid, the expression of cDNA is under the control of the 35S promoter and encoded proteins are fused with CFP.

### **Salicylic acid quantification and metabolites extraction and GC-MS analysis**

SA was quantified as described in (27).

For metabolome analysis, analytical procedures were adapted from (45).

About 100 mg of rosette leaves of the indicated lines were harvested four days after transfer in LD conditions. Samples were lyophilised, ground and metabolites were extracted by adding 500µl of cold methanol, containing 250µM of ribitol as internal standard. Extracts were then warmed at 70°C for 15min and vortexed regularly. 500µl of chlorophorm was added and samples were vortexed and warmed at 37°C for 5min. Then, 450µl of ultrapure water, containing 250µM of ribitol, was added on extracts that were centrifugated for 5min at 13 200rpm, at 4°C, to separate phases. The upper phase was collected (600µl) and 50µl of these supernatant was evaporated over-night under vacuum.

#### *Sample derivatization*

50µL of a pyridine solution was added, containing 20mg/mL of methoxyamine hydrochloride and 5µL/mL of a 2mg/mL n-alkanes mixture (retention index standards : decane, dodecane, pentadecane, octadecane, nonadecane, docosane, octacosane, dotriacontane and hexatriacontane). The tubes were sealed and heat up to 40°C



for 90 min. Then 80 µL of N,O-bis(triméthylsilyl)trifluoroacétamide was added for silylation to perform during 30 min at 40°C.

#### *GC-MS analysis*

Analyses were performed by gas chromatography (Agilent 6890) and quadrupole mass spectrometry with electron impact ionization (Agilent 5973 Network). A volume of 1 µL was injected on a Agilent J&W HP-5ms column (diameter: 0.25mm, film thickness: 0.25 µm, length: 30m) with a 0.6 mL/min helium flow. The injection parameters were : splitless injection at 230°C with a 1 min purge at 20 mL/min. The temperature gradient was : 1 min at 70°C ; 9°C min until 320°C then 10 min at 320°C, and the solvent delay was 5.4 min. The source was set to 250°C and 70 eV, scanning at 20 scans/min, from 70 to 600 m/z. Acquisition was performed with the Chemstation software (Agilent, Santa Clara, USA).

#### *Data treatment*

Semi-automated integration of chromatograms was performed with the Quanlynx software (Waters, Milford, USA) after conversion of the raw data into NetCDF format. A model ion was chosen manually to perform a correct integration for 138 peaks, with the following criterions: Gaussian shape, high relative abundance in the mass spectrum and absence of saturation in any sample. Three very abundant compounds however gave saturated signal for any ion: sucrose, citrate and malate; the samples were thus re-injected in split mode (1:30) to integrate these compounds. Metabolites were annotated according to the Chemical Analysis Working Group (Sumner *et al.*, 2007): 41 metabolites identified thanks to pure reference standards, 34 putatively annotated compounds on the basis of both spectral and retention index matches with public database (The Golm Metabolome Databases, Kopka *et al.*, 2005), 41 compounds related to known compounds or chemical classes on the unique basis of spectral match, and 10 unknown analytes. Peak surfaces were then normalized according to internal standard peak surface (ribitol) and sample fresh weight, to obtain semi-quantitative data. A fully quantitative analysis was performed for Myoinositol and Glucose with calibration curves (0, 0.01, 0.05, 0.1 and 1 g/L).

Data presented here are the average of the results obtained from four biological replicates.

#### **Pathogen resistance assays**

The virulent strain *Pseudomonas syringae* pv. tomato DC3000 (Pst-DC3000) was obtained from J. Glazebrook (University of Minnesota, St Paul, USA). Bacteria were grown overnight at 30°C in Luria Bertani medium with appropriate antibiotics (kanamycin 25 µg.mL<sup>-1</sup> and rifampicin 50 µg.mL<sup>-1</sup>). Bacteria were washed in 10 mM MgCl<sub>2</sub> and prepared for inoculations as described by Langlois-Meurinne *et al.* (46). Whole leaves of 6- to 7-week-old plants, grown in SD conditions, were infiltrated with PstDC3000 at the concentration of 10<sup>5</sup> cfu.mL<sup>-1</sup>, using a 1 mL syringe without a needle. Leaf discs (0.28 cm<sup>2</sup> each) were harvested from inoculated leaves at 0, 24 and 48 h post-inoculation (hpi). For each time point, five samples were made by pooling four leaf discs from different treated plants. The leaves of five different plants were harvested at each time point. To monitor bacterial growth, leaf discs were homogenized in 400 µL of sterile water, 6 serial dilutions (1:10) were performed for each sample. Eight 10 µL aliquots of these 1:10 serial dilutions were spotted on solid Luria Bertani (LB) medium containing kanamycin (25 µg.mL<sup>-1</sup>) and rifampicin (50 µg.mL<sup>-1</sup>) and colony numbers were quantified after 2–3



days of incubation at 30 °C. Statistical analyses of the differences between two means of log-transformed data were performed according to Wilcoxon signed-ranked test.

## References

1. Coll NS, Epple P, & Dangl JL (2011) Programmed cell death in the plant immune system. (Translated from eng) *Cell Death Differ* 18(8):1247-1256 (in eng).
2. van Doorn WG (2011) Classes of programmed cell death in plants, compared to those in animals. (Translated from English) *Journal of Experimental Botany* 62(14):4749-4761 (in English).
3. Dickman MB & Fluhr R (2013) Centrality of Host Cell Death in Plant-Microbe Interactions. (Translated from English) *Annu Rev Phytopathol* 51:543-570 (in English).
4. Marino G, Niso-Santano M, Baehrecke EH, & Kroemer G (2014) Self-consumption: the interplay of autophagy and apoptosis. (Translated from English) *Nat Rev Mol Cell Bio* 15(2):81-94 (in English).
5. Czabotar PE, Lessene G, Strasser A, & Adams JM (2014) Control of apoptosis by the BCL-2 protein family: implications for physiology and therapy. (Translated from English) *Nat Rev Mol Cell Bio* 15(1):49-63 (in English).
6. Lacomme C & Cruz SS (1999) Bax-induced cell death in tobacco is similar to the hypersensitive response. (Translated from English) *P Natl Acad Sci USA* 96(14):7956-7961 (in English).
7. Kawai-Yamada M, Jin LH, Yoshinaga K, Hirata A, & Uchimiya H (2001) Mammalian Bax-induced plant cell death can be down-regulated by overexpression of Arabidopsis Bax Inhibitor-1 (AtBI-1). (Translated from English) *P Natl Acad Sci USA* 98(21):12295-12300 (in English).
8. Watanabe N & Lam E (2006) Arabidopsis Bax inhibitor-1 functions as an attenuator of biotic and abiotic types of cell death. (Translated from English) *Plant Journal* 45(6):884-894 (in English).
9. Lorrain S, Vaillau F, Balague C, & Roby D (2003) Lesion mimic mutants: keys for deciphering cell death and defense pathways in plants? *Trends Plant Sci* 8(6):263-271.
10. Dietrich RA, *et al.* (1994) Arabidopsis mutants simulating disease resistance response. (Translated from eng) *Cell* 77(4):565-577 (in eng).
11. Mateo A, *et al.* (2004) LESION SIMULATING DISEASE 1 is required for acclimation to conditions that promote excess excitation energy. *Plant Physiol* 136(1):2818-2830.
12. Muhlenbock P, *et al.* (2008) Chloroplast signaling and LESION SIMULATING DISEASE1 regulate crosstalk between light acclimation and immunity in Arabidopsis. *Plant Cell* 20(9):2339-2356.
13. Meng PH, *et al.* (2009) Crosstalks between myo-inositol metabolism, programmed cell death and basal immunity in Arabidopsis. *PLoS One* 4(10):e7364.
14. Donahue JL, *et al.* (2010) The Arabidopsis thaliana Myo-inositol 1-phosphate synthase1 gene is required for Myo-inositol synthesis and suppression of cell death. (Translated from eng) *Plant Cell* 22(3):888-903 (in eng).
15. Wang JH & Bayles KW (2013) Programmed cell death in plants: lessons from bacteria? (Translated from English) *Trends in Plant Science* 18(3):133-139 (in English).
16. Lee KP, Kim C, Landgraf F, & Apel K (2007) EXECUTER1- and EXECUTER2-dependent transfer of stress-related signals from the plastid to the nucleus of Arabidopsis thaliana. (Translated from eng) *Proc Natl Acad Sci U S A* 104(24):10270-10275 (in eng).
17. Zurbriggen MD, *et al.* (2009) Chloroplast-generated reactive oxygen species play a major role in localized cell death during the non-host interaction between tobacco and *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*. *Plant J* 60(6):962-973.
18. Gutierrez J, *et al.* (2014) Programmed cell death activated by Rose Bengal in Arabidopsis thaliana cell suspension cultures requires functional chloroplasts. (Translated from Eng) *J Exp Bot* (in Eng).

19. Ishikawa A (2005) Tetrapyrrole metabolism is involved in lesion formation, cell death, in the Arabidopsis lesion initiation 1 mutant. *Biosci Biotechnol Biochem* 69(10):1929-1934.
20. Schneeberger K, *et al.* (2009) SHOREmap: simultaneous mapping and mutation identification by deep sequencing. (Translated from eng) *Nat Methods* 6(8):550-551 (in eng).
21. Nakanishi H, *et al.* (2005) Characterization of the Arabidopsis thaliana mutant pcb2 which accumulates divinyl chlorophylls. (Translated from English) *Plant and Cell Physiology* 46(3):467-473 (in English).
22. Chi W, Sun X, & Zhang L (2013) Intracellular signaling from plastid to nucleus. (Translated from eng) *Annu Rev Plant Biol* 64:559-582 (in eng).
23. Pontier D, Albrieux C, Joyard J, Lagrange T, & Block MA (2007) Knock-out of the magnesium protoporphyrin IX methyltransferase gene in Arabidopsis. Effects on chloroplast development and on chloroplast-to-nucleus signaling. (Translated from eng) *J Biol Chem* 282(4):2297-2304 (in eng).
24. Susek RE, Ausubel FM, & Chory J (1993) Signal transduction mutants of Arabidopsis uncouple nuclear CAB and RBCS gene expression from chloroplast development. *Cell* 74(5):787-799.
25. Koussevitzky S, *et al.* (2007) Signals from chloroplasts converge to regulate nuclear gene expression. *Science* 316(5825):715-719.
26. Mochizuki N, Brusslan JA, Larkin R, Nagatani A, & Chory J (2001) Arabidopsis genomes uncoupled 5 (GUN5) mutant reveals the involvement of Mg-chelatase H subunit in plastid-to-nucleus signal transduction. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98(4):2053-2058.
27. Bruggeman Q, *et al.* (2014) The polyadenylation factor subunit CPSF30: a key factor of programmed cell death and a regulator of immunity in Arabidopsis. (Translated from Eng) *Plant Physiol* (in Eng).
28. Queval G, *et al.* (2007) Conditional oxidative stress responses in the Arabidopsis photorespiratory mutant cat2 demonstrate that redox state is a key modulator of daylength-dependent gene expression, and define photoperiod as a crucial factor in the regulation of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced cell death. *Plant J* 52(4):640-657.
29. Estavillo GM, *et al.* (2011) Evidence for a SAL1-PAP chloroplast retrograde pathway that functions in drought and high light signaling in Arabidopsis. (Translated from eng) *Plant Cell* 23(11):3992-4012 (in eng).
30. Gy I, *et al.* (2007) Arabidopsis FIERY1, XRN2, and XRN3 are endogenous RNA silencing suppressors. (Translated from eng) *Plant Cell* 19(11):3451-3461 (in eng).
31. Latrasse D, *et al.* (2013) Dual function of MIPS1 as a metabolic enzyme and transcriptional regulator. (Translated from Eng) *Nucleic Acids Res* (in Eng).
32. Colcombet J & Hirt H (2008) Arabidopsis MAPKs: a complex signalling network involved in multiple biological processes. (Translated from eng) *Biochem J* 413(2):217-226 (in eng).
33. Xiao YM, Wang JZ, & Dehesh K (2013) Review of stress specific organelles-to-nucleus metabolic signal molecules in plants. (Translated from English) *PLANT SCIENCE* 212:102-107 (in English).
34. Kim C, *et al.* (2012) Chloroplasts of Arabidopsis are the source and a primary target of a plant-specific programmed cell death signaling pathway. (Translated from eng) *Plant Cell* 24(7):3026-3039 (in eng).
35. Foyer CH & Noctor G (2005) Redox homeostasis and antioxidant signaling: a metabolic interface between stress perception and physiological responses. (Translated from eng) *Plant Cell* 17(7):1866-1875 (in eng).
36. Panikulangara TJ, Eggers-Schumacher G, Wunderlich M, Stransky H, & Schoffl F (2004) Galactinol synthase1. A novel heat shock factor target gene responsible for heat-induced synthesis of raffinose family oligosaccharides in arabidopsis. (Translated from English) *Plant Physiology* 136(2):3148-3158 (in English).
37. Vogel MO, *et al.* (2014) Fast Retrograde Signaling in Response to High Light Involves Metabolite Export, MITOGEN-ACTIVATED PROTEIN KINASE6, and AP2/ERF Transcription Factors in Arabidopsis. (Translated from English) *Plant Cell* 26(3):1151-1165 (in English).
38. Kunkel BN & Brooks DM (2002) Cross talk between signaling pathways in pathogen defense. (Translated from English) *Current Opinion in Plant Biology* 5(4):325-331 (in English).

39. Ellis C, Karafyllidis L, & Turner JG (2002) Constitutive activation of jasmonate signaling in an Arabidopsis mutant correlates with enhanced resistance to *Erysiphe cichoracearum*, *Pseudomonas syringae*, and *Myzus persicae*. (Translated from English) *Mol Plant Microbe In* 15(10):1025-1030 (in English).
40. Petrillo E, *et al.* (2014) A Chloroplast Retrograde Signal Regulates Nuclear Alternative Splicing. (Translated from English) *Science* 344(6182):427-430 (in English).
41. Alonso JM, *et al.* (2003) Genome-wide insertional mutagenesis of *Arabidopsis thaliana*. *Science* 301(5633):653-657.
42. Scholl RL, May ST, & Ware DH (2000) Seed and molecular resources for *Arabidopsis*. *Plant Physiol* 124(4):1477-1480.
43. Edwards K, Johnstone C, & Thompson C (1991) A simple and rapid method for the preparation of plant genomic DNA for PCR analysis. (Translated from eng) *Nucleic Acids Res* 19(6):1349 (in eng).
44. Pacurar DI, *et al.* (2012) A collection of INDEL markers for map-based cloning in seven *Arabidopsis* accessions. (Translated from English) *Journal of Experimental Botany* 63(7):2491-2501 (in English).
45. Roessner-Tunali U, *et al.* (2003) Metabolic profiling of transgenic tomato plants overexpressing hexokinase reveals that the influence of hexose phosphorylation diminishes during fruit development. (Translated from English) *Plant Physiology* 133(1):84-99 (in English).
46. Langlois-Meurinne M, Gachon CMM, & Saindrenan P (2005) Pathogen-responsive expression of glycosyltransferase genes UGT73B3 and UGT73B5 is necessary for resistance to *Pseudomonas syringae* pv tomato in *Arabidopsis*. (Translated from English) *Plant Physiology* 139(4):1890-1901 (in English).

### Annexe 3. Oligonucléotides utilisés

Amorce	Séquence (5' - 3')
BIG-LP1	ACTGGTGCTGATGAGATCCAC
BIG-LP3	ATTTGTATGACAAACAGCCGCTC
BIG-RP1	AAAGTGGAGAGGACGTATTCCAG
BIG-RP3	CTTTATTGAGAGCCCCAGTCC
CAT2-LP	TCAGGGAACCTTCATCCCATCGC
CAT2-RP	CCCAGAGGTACCTCTTCTTCTCCCATG
CPR5-fwd	CCAATCCGGCGAATTCAAAGCC
CPR5-rev	GACCTGCGGCATTCTTTCTCGC
CPSF30-small-fwd	TGGAGGATGCTGATGGACTT
CPSF30-small-rev	AGAACCCAATTAAAAACCTTAG
ex1 RP	CACTCCCTCCTCCAAAAGATC
ex1 LP	TACCCCAATCACTCAAATTGG
ex2-1 dir mut	CATGGGTTCAGCCACATTGAC
ex2-1 Wt rev	GGAACAAAGCCAAGGAGTAG
gun1-1 dir	GCTAAGAGGATTTTCGAAACTGT
gun950rev	CTCCATCCCGCCTTTACCGCAAG
HXK1-2-fwd	ATGATTGGTGCTACCAGAACTTAG
HXK1-2-rev	CTCCAACAGCTACTTTACCCATTTT
Lb6316	TCAAACAGGATTTTCGCCTGCT
Lba1	TGGTTCACGTAGTGGGCCATCG
LSD1-LP	CTGGGATTTGTAAAGCAGCTG
LSD1-RP	TCAAGTTCATGGAGCAAAAG
MIPS1-LP	TTGCTAGCAACCATATCGTCC
MIPS1-RP	TTCGTGTCGGATCTTTTAACG
MIPS2-2-LP	ATGGATCAACACTAACCGCTG
MIPS2-2-RP	CTCACAATCGAAGTAGGCTGC
MIPS3-2-LP	AAGTCATCACCAACCGATCAAG
MIPS3-2-RP	ATTCGGGTCATTAACCCAAG
MPK4-LP	GTGACAATGCAAGAAGATACGTTAGACAGC
MPK4-RP	CTTGAAATATCTACAGAGTTGGTGTG
myo Xba dir	ACTCACACCCCAAAACCGATCCA
SAL1 LP	CTTCGAATGACTCGAAGAACG
SAL1 RP	TTTTCGATTCAATCATGACCC
Tag3	TGATACCAGACGTTGCCCCGCATAA
Tag5	CTACAAATTGCCTTTTCTTATCGAC
VTC4-LP	GGCAGAAGCAGTAGACGATTG
VTC4-RP	TCACACCAAATGCAGCTGTAG

Tableau 6. Amorces utilisées pour le génotypage des lignées mutantes.

Lignée mutante	Allèle sauvage	Allèle mutant
<i>big-1</i>	BIG-LP1 + BIG-RP1	BIG-RP1 + Lba1
<i>big-3</i>	BIG-LP3 + BIG-RP3	BIG-RP3 + Lba1
<i>cat2</i>	CAT2-LP + CAT2-RP	CAT2-RP + Lba1
<i>cpr5</i>	CPR5-fwd + CPR5-rev	CPR5-fwd + Tag5
<i>ex1</i>	ex1 LP + ex1 RP	ex1 RP + Lba1
<i>ex2</i>	ex2-1 dir mut + ex2-1 Wt rev	ex2-1 dir mut + Lba1
<i>gun1-1</i>	gun1-1 dir + gun950rev (séquençage du produit PCR)	
<i>fry1-6</i>	SAL1 LP + SAL1 RP	SAL1 RP + Lba1
<i>hxl1-2</i>	HXK1-2-fwd + HXK1-2-rev	HXK1-2-rev + Tag5
<i>lsd1</i>	LSD1-LP + LSD1-RP	LSD1-RP + Lba1
<i>mips1</i>	MIPS1-LP + MIPS1-RP	MIPS1-RP + Lba1
<i>mips1-2</i>	MIPS1-LP + myo Xba dir	MIPS1-RP + Tag3
<i>mips2-2</i>	MIPS2-2-LP + MIPS2-2-RP	MIPS2-2-RP + Lba1
<i>mips3-2</i>	MIPS3-2-LP + MIPS1-RP	MIPS1-RP + Lba1
<i>mpk4</i>	MPK4-LP + MPK4-RP	MPK4-RP + Lb6316
<i>oxl6</i>	CPSF30-small-dir + CPSF30-small-rev	CPSF30-small-dir + Lba1
<i>vtc4</i>	VTC4-LP + VTC4-RP	VTC4-RP + Lba1

**Tableau 7. Couples d'amorces utilisés pour le génotypage des lignées mutantes.**

Amorce	Séquence (5' - 3')	
29100BamHIATG	CGCGGATCCATGAATAGAGGTGTGTTGGAG	
29100XhoIend	TTGGCTCCGCCGGTTTCCACTCGAGCGG	
29130BamHIATG	CGCGGATCCATGGGTAAAGTAGCTGTTGGA	
29130XhoIend	CCGCTCGAGGAGTCTTCAAGGTAGAGAGA	
BAMH1-XPO1b-fwd	CGCGGATCCTATATGGCTGCCGAGAAGTTAAGAG	
HXK1-G104D-fwd	GCATTGGACCTAGGGGATACAACTTCCGTGTC	Acide aminé modifié : Gly104Asp
HXK1-G104D-rev	GACACGGAAGTTTGTATCCCCTAGGTCCAATGC	
HXK1-S177A-fwd	GAATTAGGTTTCACTTTCGCGTTTCCTGTTAAGCAG	Acide aminé modifié : Ser177Ala
HXK1-S177A-rev	CTGCTTAACAGGAAACGCGAAAGTGAAACCTAATTC	
PCB2 kpn1dir	GCGGTACCATGTCACTTTGCTCTTCCTTC	
PCB2 ECOR1 rev	CGGAATTCGGGAAGAAGTGTTCACCGAGTTC	
NCO1-XPO1-fwd	GGTCCATGGTAGTAGAACAGGAAAACAG	
NCO1-XPO1-rev	ACTACCATGGACCCAGAAATAGACC	
SAL1-XPO1b-rev	GACGTCGACGAATCGGCCATGTCGTCTTG	

**Tableau 8. Amorces utilisées pour les clonages.**

Amorce	Séquence (5' - 3')
BIG-PCRq-4-fwd	CCGTAGGGTCTTTCTCCAGC
BIG-PCRq-4-rev	CGGTTAAGGTTTCTGCGTCTTG
CPSF30big-fwd	ATCCACCAGCAACATCATCAGC
CPSF30big-rev	CCCGACACTCCTCTCTCATC
CPSF30small-fwd	ACACCAGGTCAGCCAGACTC
CPSF30small-rev	AACCTTAGGACTCTGAACACAC
EDS1_qPCR_dir1	AGAAGGGATGCTTGGAGAATGG
EDS1_qPCR_rev1	CGCAGAGGAGAATGCGATTTG
GRX480_qPCR_dir	TGAATCCGGCGGTCCTTGAG
GRX480_qPCR_rev	TCTAACCCCTCCAAACAACCTCC
HXK1qPCR-fwd	GCTCTGGAAAGAGTTGGTCTTG
HXK1qPCR-rev	TATCTACCACCGGCTAGTGTTCC
ICS1-fwd	TTTTGGTGGCGAGGAGAGTG
ICS1-rev	CTCCAGCTACTATCCCTGTCC
MIPS1qPCR-fwd	CAAATCCGAGGGAGAGGGAAAGTTTC
MIPS1qPCR-rev	TGCGTTAATCACCGGAGTTCCC
MIPS2qPCR-fwd	TAAAGCTGAAGGAGAGGGGAAGTTTC
MIPS2qPCR-rev	AGGTACCTTTACTTCTTCTTCCTCATGC
MIPS3qPCR-fwd	CATGAGTGAAAAGGAGGGAAAGTTTC
MIPS3qPCR-rev	ACAAAGCATTAACAACCTGGCGTG
NPR1_qPCR_dir	GATTCTTCCCGCGCTGTTCG
NPR1_qPCR_rev	TCGTCTTCTCCGCAAGCCAG
PAD3_qPCR_dir	TGTTGTAGTCGACCAGAGGC
PAD3_qPCR_rev	CCGCATCAGACTCCACTCG
PR1-Fwd	ACTACAACCTACGCTGCGAACAC
PR1-rev	TCACTTTGGCACATCCGAGTC
PR4-fwd	ACGGAGGCTTGGATTTGGATGTAG
PR4-rev	CGATCAATGGCCGAAACAAGCATG
PR5-fwd	TGTCGTGGCCTGCAAGAGTG
PR5-rev	AGTCCGTGGGAGGACAAGTTTC
SAUR19_qPCR_fwd	ATTTGGTGCCGCTCTCATAC
SAUR19_qPCR_rev	TTCATTGGAGCCGAGAAGTC
SNC1_qPCR_dir	GCCGGATATGATCTTCGGAA
SNC1_qPCR_rev	CGGCAAGCTCTTCAATCATGG
UBQ10-fwd	GGCCTTGATAATCCCTGATGAATAAG
UBQ10-rev	AAAGAGATAACAGGAACGGAAACATAGT

**Tableau 9. Amorces utilisées pour les expériences de RT-PCRq.**

Marqueur microsatellite	Numéro du chromosome ciblé	Amorce sens (5' → 3')	Amorce antisens (5' → 3')
F21M12	1	GGCTTTCTCGAAATCTGTCC	TTACTTTTTGCCTCTTGTCATTG
ciw12	1	AGGTTTTATTGCTTTTCACA	CTTTCAAAAGCACATCACA
T27K12-SP6	1	GGAGGCTATACGAATCTTGACA	GGACAACGTCTCAAACGGTT
ciw1	1	ACATTTTCTCAATCCTTACTC	GAGAGCTTCTTTATTTGTGAT
nga280	1	CTGATCTCACGGACAATAGTGC	GGCTCCATAAAAAGTGCACC
nga111	1	CTCCAGTTGGAAGCTAAAGGG	TGTTTTTTAGGACAAATGGCG
LUGSSLP41	2	TGCATCAGTTTTGGTTGTGTGATCT	GCTGTATTTTCCATAGGGGGCA
MSAT2.66	2	GAACCTTACCCCCCTTTAG	GGTTTCTACTCGGGATCTC
MSAT2.41	2	GACTGTTTCATCGGATCCAT	ACAAACCATTGTTGGTCGTG
nga168	2	TCGTCTACTGCACTGCCG	GAGGACATGTATAGGAGCCTCG
MSAT2.9	2	TAAAAGAGTCCCTCGTAAAG	GTTGTTGTTGTGGCATT
nga172	3	CATCCGAATGCCATTGTTC	AGCTGCTTCCTTATAGCGTCC
nga162	3	CATGCAATTTGCATCTGAGG	CTCTGTCACTCTTTTCTCTGG
ciw11	3	CCCCGAGTTGAGGTATT	GAAGAAATTCCTAAAGCATTC
MSAT3.60	3	CCAAAAAAGAAAGAAAGA	TTTCATGGACCGACC
Ciw24	3	TACCCAAATACAAAGCACTG	GAATCAACCCAAAAAGAAAA
JV32/33	4	GCCGCTCAACATGCTATAAA	TGTGTGGTCAGGAATTAACAAA
MSAT4.25	4	GAATGGTTGTTGATAGTTGA	AAATTTCAAGGAGGTGATAGA
MSAT4.15	4	TTTCTTGTCTTTCCCTGAA	GACGAAGAAGGAGACGAAAA
MSAT4.33	4	TTCTTTGACACGCAAACA	TGGTGACATAGACCCAATG
Ciw18	5	AACACAACATGGTTTCAGT	GCCGTTTGTCTCTTCAC
ICE5	5	AACAACCCTATCTTCTTCTG	TGTGACCCCTTACTCAATA
SO191	5	CTCCACCAATCATGCAAATG	TGATGTTGATGGAGATGGTCA
ciw9	5	CAGACGTATCAAATGACAAATG	GACTACTGCTCAAATATTCCGG
MSAT5.19	5	AACGCATTTGCTGTTTCCCA	ATGGTTATCTCATCTGGTCT

**Tableau 10. Amorces utilisées pour la cartographie par « Bulk segregant analysis ».**

Amorce	Séquence (5' - 3')
At4g24610-caps-fwd	GAAGGATGGTTTTTCGTCCA
At4g24610-caps-rev	GAGGGGTAGCCAGATAGCAA
At4g25320-caps-fwd	AACACAACAAATGCGGTTCA
At4g25320-caps-rev	CCGCTCGAGCTCGGAATCTCGTTGTCAGA
At4g29100-caps-fwd	CGTTGCCACCACATATGACT
At4g29100-caps-rev	CAAGATCATGTTCATGTGCGTA
HXK1-caps-fwd	TTGGTCTTGACATGCGAATC
HXK1-caps-rev	ACCTGAAGTTTCCCCATTCC
XPO1b-dcaps2-fwd	AATGACTGTATATCTTCTTTACCTTTA <u>AG</u>
XPO1b-dcaps2- rev	CAAATGCCAACCATCATCCCTCG
APC11-dcaps -fwd	GCAGAAGAGAATGGCAGTTCAAAGAGTA <u>AC</u>
APC11-seq-rev	AGCAATCAAACCAAGGACAAGC
MAPKKK6-dcaps2-r	TTTGATGCTTCTTGTTGTTAATTTC <u>GTCG</u>
MAPKKK6-dcaps-f	CAACGATCCGAGATACTTGAC

**Tableau 11. Amorces pour amplification des marqueurs CAPS et dCAPS.**

Gène	Couple d'amorce	Enzyme de digestion
APC11	APC11-dcaps –fwd + APC11-seq-rev	DdeI
At4g24610	At4g24610-caps-fwd + At4g24610-caps-rev	HindIII
At5g25320	At4g25320-caps-fwd + At4g25320-caps-rev	TaqI
Atg29100	At4g29100-caps-fwd + At4g29100-caps-rev	AluI
HXK1	HXK1-caps-fwd + HXK1-caps-rev	EcoRV
MAPKKK6	MAPKKK6-dcaps2-r + MAPKKK6-dcaps-f	SalI
XPO1b	XPO1b-dcaps2-fwd + XPO1b-dcaps2- rev	HindIII

**Tableau 12. Couples d'amorces et enzymes de restriction pour les marqueurs CAPS et dCAPS.**





## Résumé

La Mort Cellulaire Programmée (MCP) est un processus essentiel pour plusieurs aspects de la vie des plantes, incluant le développement et les réponses aux stress. Des analyses génétiques ont permis d'identifier plusieurs acteurs clés de la MCP chez *Arabidopsis thaliana*, dont l'enzyme MIPS1, qui catalyse une étape limitante de la biosynthèse du *myo*-inositol (MI), composé cellulaire majeur à l'origine de nombreux dérivés. Une des caractéristiques les plus importantes du mutant *mips1*, désactivé pour cette protéine, est l'apparition de lésions sur les feuilles de rosette, dépendante des conditions lumineuses et due à de la MCP impliquant la voie de l'acide salicylique. Ces données avaient permis de révéler un rôle du MI, ou de ses dérivés, dans le contrôle de la MCP.

Mon travail de thèse a consisté à rechercher et à caractériser des supprimeurs du mutant *mips1* par deux approches complémentaires : une approche gène candidat par comparaison de transcriptome et une stratégie de génétique directe suite au crible de mutations secondaires extra-géniques abolissant le phénotype de mort cellulaire de *mips1*.

Les analyses effectuées sur différents supprimeurs ont mis en évidence l'implication de plusieurs facteurs dans la MCP, tels que le facteur de polyadénylation CPSF30, d'une hexokinase ou encore de la protéine PCB2 intervenant dans la biosynthèse de la chlorophylle. La caractérisation de ces supprimeurs a permis de démontrer l'importance de différentes voies comme la maturation des ARNm, le métabolisme carboné primaire ou l'activité chloroplastique dans le contrôle de la MCP dépendante de l'accumulation de MI.

Ce travail apporte de nombreuses perspectives, visant à mieux appréhender les différentes voies de régulation de la MCP indispensables pour un développement correct et pour faire face à des stress biotiques et abiotiques chez les plantes.

## Summary

Programmed cell death (PCD) is essential for several aspects of plant life, including development and stress responses. Mutational analyses have identified several key PCD components in *Arabidopsis thaliana*, as the enzyme MIPS1 catalysing the limiting step of *myo*-inositol (MI) synthesis, crucial cellular compound at the root of many derivatives. One of the most striking features of *mips1*, disrupted for this protein, is the light-dependent formation of lesions on leaves due to Salicylic Acid (SA)-dependent PCD, revealing roles for MI or inositol derivatives in the regulation of PCD.

My thesis work was to find and characterize suppressor of *mips1* mutant using two complementary approaches: a gene candidate approach by transcriptomic comparisons and a strategy of direct genetic by screening for extra genic secondary mutations that abolish *mips1* cell death phenotype.

Analysis of different suppressors revealed the involvement of several factors in MCP, such as the polyadenylation factor CPSF30, a hexokinase or the protein PCB2 operating in chlorophyll biosynthesis. Characterization of these suppressors allowed us to demonstrate crucial role of functions as mRNA maturation, primary carbohydrate metabolism or chloroplastic activity in the regulation of MCP depending on MI accumulation.

This work brings many opportunities, to better understand the different regulatory pathways of PCD essential for proper development and to cope with biotic and abiotic stress in plants.